

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES D'AFRIQUE OCCIDENTALE FRANÇAISE (SÉNÉGAL, GUINÉE, COTE D'IVOIRE)

par A.-R. PRÉVOT.

*(Institut Pasteur, service des Anaérobies,
et Institut intercolonial d'Adiopodoumé.)*

En juillet-août 1946 nous avons prélevé 60 échantillons de terre en A. O. F. (1) dans le but d'étudier les bactéries anaérobies tropicales et équatoriales, leur répartition, leurs associations. Nous pensons que c'est la première étude bactériologique des sols de l'A. O. F.

Les prélèvements ont été pratiqués à des profondeurs différentes (de 10 à 50 cm.) et dans des sols différents : savanes sèches et humides de plaines ; forêts primaires de plaine et de montagne, savanes brûlées (en vue du défrichement) ; plantations de cultures vivrières ; terres stériles ; poto-poto ; lagune Ebrié. Géographiquement, ces prélèvements ont été pratiqués :

1° En Côte d'Ivoire (38 prélèvements) dans les régions de Bingerville, d'Adiopodoumé, des savanes et des forêts de la route d'Abidjan à N'Zo, de la région de Man et du Tonkui.

2° En Guinée française, dans la région de N'Zo et du Nimba (13 prélèvements).

3° Au Sénégal dans la plaine limoneuse de M'Bao (8 prélèvements).

(1) Grâce à l'appui du C. N. R. S., de l'Office de la Recherche scientifique coloniale, de l'Institut intercolonial d'Adiopodoumé et de l'Institut Pasteur de Dakar.

Ces prélèvements ont été effectués avec des instruments stériles, placés en flacons stériles, bouchés et rapportés immédiatement en France par avion où leur analyse a commencé aussitôt.

Nous avons ainsi isolé 180 souches bactériennes, dont 103 aérobies et 77 anaérobies stricts, ces derniers appartenant à 42 espèces différentes, dont 9 espèces nouvelles.

Quelques-uns de ces échantillons ont été analysés dans d'autres laboratoires : 1° par M. Duché qui y a trouvé des Actinomycètes semblables à ceux de terres françaises ; 2° par M^{me} Delaporte qui a reconnu le groupe *B. subtilis*-*B. mesentericus* abondamment représenté et ceci par des souches semblables aux souches françaises ; 3° par M^{me} H. Winogradsky qui n'y a trouvé aucune souche de sulfuraire mais y a isolé une souche de *Rhodobactérie* ; enfin 4° par J. Pochon et Y. T. Tchan qui y ont décelé une espèce nouvelle de bactérie oligonitrophile [5] et ont étudié le rôle que cette dernière peut jouer dans la biologie des sols tropicaux.

Sur les 106 souches aérobies que nous avons isolées, 105 appartenaient au genre *Bacillus*, groupe *subtilis-mesentericus*. Quelques-unes de ces souches ont été étudiées par P. Nicolle, qui n'y a décelé aucune souche lysogène. L'unique souche aérobie n'appartenant pas au genre *Bacillus* était *Serratia piscatoria*, richement pigmentée en rouge groseille et seul microbe Gram-négatif isolé en terre africaine.

Trois observations principales ont pu être faites :

I. — L'absence d'humus en plaine, qu'il s'agisse des savanes ou des forêts, est vraisemblablement due à un métabolisme bactérien très intense qui détruit totalement et rapidement toute matière organique, destruction due à la température élevée et à l'humidité, plus qu'à la nature même des bactéries, puisqu'on retrouve sensiblement les mêmes espèces en montagne (Tonkui, Nimba), là où l'humus est très abondant parce que la température est plus basse et se rapproche des températures européennes.

II. — Les savanes brûlées pour défrichage sont dépourvues de bactéries. Cette pratique est donc néfaste puisqu'elle prive les sols de leurs éléments fertilisateurs naturels.

III. — Les zones d'apparence stérile ne le sont que pour les végétaux supérieurs. La flore bactérienne y est aussi dense et de la même composition que celle des zones fertiles témoins avoisinantes. Ce n'est donc pas une stérilité absolue affectant la flore microbienne.

Etude des Anaérobies.

Les espèces suivantes ont été isolées, dans l'ordre de leur fréquence : *Cl. sporogenes* : 11 souches ; *Cl. valerianicum* : 6 souches ; *Cl. caproicum* : 6 souches ; *Cl. hastiforme* : 3 souches ;

Pl. carnis : 3 souches ; *Cl. corallinum* : 3 souches ; *I. mangeloti* : 2 souches ; *Cl. pseudofallax* : 2 souches ; *Cl. septicum* : 2 souches ; *Cl. bifermentans* : 2 souches ; *Cillobacterium moniliforme* : 2 souches ; *Cillob. combesi* : 2 souches ; *A. dubitatus* : 2 souches ; *I. litus eburense* : 2 souches ; *I. teras* : 2 souches ; *Cl. hemolyticum* : 1 souche ; *Cl. saturni-rubrum* : 1 souche ; *I. talis* : 1 souche ; *Cl. butyricum* : 1 souche ; *Cl. sextum* : 1 souche ; *Cl. mitelmani* : 1 souche ; *Eubact. foedans* : 1 souche ; *Pl. caloritolerans* : 1 souche ; *Cillob. guinaeensis* : 1 souche ; *Eub. quartum* : 1 souche ; *W. perfringens* : 1 souche ; *Cl. fallax* : 1 souche ; *Cl. tonkinensis* : 1 souche ; *Cl. roseum* : 1 souche ; *Cillob. multiforme* : 1 souche ; *Cillob. endocarditis* : 1 souche ; *Cl. pruchii* : 1 souche ; *Pl. fluxum* : 1 souche ; *Cl. irregularis* : 1 souche ; *Infl. setiensis* : 1 souche ; *Cl. carnofoetidum* : 1 souche ; *Cl. sardiniensis* : 1 souche ; *Pl. indologenes* : 1 souche ; *Cl. aérofoetidum* : 1 souche ; *Cl. limosum* : 1 souche ; *Cl. lacunarum* : 1 souche ; *Cl. silvestris* : 1 souche.

On voit par ce tableau : 1° la rareté des espèces pathogènes ; 2° la prédominance des protéolytiques non toxigènes (*Cl. sporogenes*, *Cl. valerianicum*, *Cl. caproicum*) ; 3° la présence des *Clostridium* pectinolytiques colorés (rouges ou roses).

I. — ANAÉROBIES PATHOGÈNES.

W. perfringens (Souche A33G). Alors que dans les sols de la France l'espèce *perfringens* est extrêmement fréquente, une seule souche a été isolée en Afrique sur 60 échantillons, et cela dans un échantillon d'humus de la forêt primaire de la montagne du Ton-Kui, à 1.300 m. d'altitude, dans un endroit très peuplé (plantations de quinquina). L'apport fécal humain ou animal y est fort probable ; la souche était du type A, peu pathogène (DMm=2 cm³), peu toxique (DMm=0,5 cm³), peu hémolytique (DHm=0,01 cm³), entièrement neutralisée par le sérum de l'Institut Pasteur.

Cl. septicum (Souches A26A et A41A). La première de ces souches a été isolée à 1.136 m. d'altitude dans la plantation de quinquina du Ton-Kui ; la seconde dans la forêt primaire entre Daloa et Bouaflé. Toutes les deux étaient peu pathogènes (DMm=1,3 cm³), peu toxiques (DMm=0,05 cm³), peu hémolytiques (DH=0,02 cm³). Dans les 2 cas l'apport fécal humain et animal était probable. Ces 2 souches étaient entièrement neutralisées par le sérum de l'Institut Pasteur.

Cl. sardiniensis (Souche A48E). Cette souche a été isolée dans la plantation d'ananas d'Adiopodoumé. L'apport fécal animal est probable (proximité de la ferme de l'Institut Intercolonial). Cette souche était peu pathogène (DMm=2 cm³), assez toxique :

toxine se rapprochant de celle de *Cl. chauvoei*, c'est-à-dire tuant la souris très rapidement, et très hémolytique ($DH=0,005$). La toxine est partiellement neutralisée par le sérum anti-œdématisiens et l'hémolysine est totalement neutralisée par le sérum anti-*Cl. septicum*. Cette espèce n'avait été trouvée jusqu'ici qu'en Sardaigne.

Cl. hemolyticum (Souche A 6DI). Isolée dans la partie marécageuse de la forêt d'Adiopodoumé. Peu pathogène ($DMm=2\text{ cm}^3$), peu toxique ($DM=0,5\text{ cm}^3$), mais assez hémolytique ($DH=0,02\text{ cm}^3$). Cette espèce n'avait été trouvée jusqu'ici qu'en Amérique du Sud.

Infabilis teras (Souches A9H et A11B). Isolées, la première d'une savane inculte près de Toumodi, l'autre d'un échantillon de poto-poto près de Danané. Peu pathogènes, mais très hémolytiques. Cette espèce n'avait été isolée jusqu'ici qu'en Europe.

Ainsi les espèces anaérobies pathogènes sont très rares dans les sols d'A. O. F. Les 7 souches isolées représentent 9 p. 100 du total des souches ; de plus on ne les trouve que dans le voisinage des lieux habités par l'homme et les animaux domestiques ce qui prouve leur origine intestinale probable. Elles sont très peu pathogènes. On ne les rencontre jamais dans les forêts primaires non fréquentées par l'homme, ni dans les savanes désertes et incultes, ni sur le sommet des montagnes non habitées.

Ces faits peuvent expliquer l'extrême rareté des gangrènes en A. O. F., l'absence de complications infectieuses des plaies, même souillées de terre et la rapidité avec laquelle elles guérissent, rapidité qui a frappé tous les médecins de brousse.

II. — ANAÉROBIES NON PATHOGÈNES.

A. — Espèces connues.

a) CLOSTRIDIACÉES. — *Cl. sporogenes* (11 souches). Cette espèce est de beaucoup la plus fréquente des anaérobies des sols d'A. O. F. On la trouve aussi bien dans la plaine qu'en montagne, dans la forêt que dans la savane, le poto-poto et la boue des lagunes. Aucune de ces souches n'était pathogène. Toutes appartenaient à une variété nouvelle : *Cl. sporogenes* var. *africanum*, caractérisée par de grosses colonies en oursin, une thermorésistance élevée, une très grande mobilité, un pouvoir protéolytique très élevé, un pouvoir fermentaire très marqué avec haute production d'ammoniaque et d'acides volatils ; l'absence de réduction des nitrates en nitrites.

Cl. caproicum (6 souches). Sous ce nom, Rodella a décrit un *Clostridium* protéolytique, qui a été par la suite [4] reconnu par nous comme très voisin de *Cl. bifermentans*. Le caractère sur

lequel Rodella s'était appuyé pour individualiser cette espèce était la forme de la courbe de Duclaux des acides volatils produits, courbe pouvant s'interpréter comme un mélange d'acides acétique et caproïque. Les courbes de Duclaux de nos souches pouvaient s'interpréter respectivement : $\frac{\text{caproïque}}{\text{acétique}}$ 1 p. 2 ; 1 p. 1 ;

1 p. 2 ; 1 p. 4 ; 1 p. 1 ; 1 p. 4. Par la suite avec G. Cohen et G. Bazire-Cohen nous avons reconnu qu'elles pouvaient également s'interpréter comme isobutyrique+acétique, de sorte que cette espèce se rapprocherait encore plus de *Cl. bifermentans*. Néanmoins, comme la substance visqueuse des cultures est moins abondante et la mobilité beaucoup plus marquée, il est prudent de leur garder l'étiquette *Cl. caproicum* jusqu'à ce que l'analyse de leur structure antigénique ait été réalisée. Pas de réduction des nitrates en nitrites.

Cl. valerianicum (6 souches). Cette espèce, également individualisée par Rodella par la production d'acide valérianique, se rapproche énormément de *Cl. bifermentans*. Néanmoins elle donne une production d'acide valérianique plus élevée que celui-ci, qui a été pour toutes nos souches respectivement $\frac{\text{valérianique}}{\text{acétique}} =$

1 p. 1. Pas de réduction des nitrates en nitrites.

Ici encore, nous devons prudemment conserver cette dénomination tant qu'une analyse plus poussée des antigènes n'aura pas prouvé l'identité des 2 espèces.

Cl. bifermentans (2 souches). Nous n'avons trouvé que 2 souches répondant à la description exacte de Tissier et Martelly et aux recherches ultérieures faites sur cette espèce. Elles étaient très richement sporulées, très visqueuses et produisaient les acides acétique, butyrique, valérianique et lactique. L'une d'elles produisait les acides isobutyrique et formique. Pas de réduction des nitrates en nitrites.

Cl. hastiforme (3 souches). Deux de ces souches étaient normales et ne donnaient pas de scatol. La troisième peut être considérée comme la variété scatologène de l'espèce-type. Toutes les trois étaient des ferments formo-butyriques-lactiques, producteurs d'amines volatiles, d'éthanol et d'acétyl-méthyl-carbinol.

Aucune ne réduisait les nitrates en nitrites. Aucune n'était pathogène pour le cobaye.

Cl. aerofotidum (1 souche). Cette souche provenant du Sénégal est semblable aux souches d'origine française. Cependant, elle est légèrement hémolytique *in vitro*, bien que non pathogène. Elle est biochimiquement très active, donnant beaucoup d' NH_3 , de SH_2 , d'éthanol, d'amines volatiles et d'acétone, ainsi que beaucoup d'acides volatils, surtout butyrique.

Cl. tonkinensis (1 souche). Cette espèce décrite par Bruneau au

Tonkin, n'avait pas encore été retrouvée depuis sa description. Sa présence en Côte d'Ivoire est une donnée nouvelle de son écologie. C'est un ferment gazogène et putride, très glucidolytique, produisant des quantités énormes d'indol et de phénol. Type fermentaire acéto-butyro-lactique, donnant aussi acétone et acétyl-méthyl-carbinol.

Cl. butyricum (1 souche). La seule caractéristique de cette souche est sa production de phénol et son pouvoir glucidolytique très restreint. C'est donc une variété de l'espèce-type.

Cl. sextum (1 souche). Souche normale, présentant toutefois un pouvoir gélolytique très marqué, et réduisant les nitrates en nitrites en présence de glycérine et de glucose. Son pouvoir hémolytique *in vitro* était aussi très accusé, et elle produisait chez le cobaye une escarre nécrotique qui guérissait spontanément.

Cl. pseudofallax (2 souches). Absolument normales.

Cl. fallax (1 souche). Normale, sauf colonies irrégulières.

Cl. pruchii (1 souche). Souche normale réduisant les nitrates en nitrites en présence de lactose seulement.

Cl. carnofoetidum (1 souche). Souche normale, ferment propionique-valérianique-lactique, produisant indol et scatol, SH_2 , NH_3 , amines, alcools, cétone.

Cl. irregularis (1 souche) peu glucidolytique ; ferment acéto-valérianique lactique.

Cl. mitelmani (1 souche) variété glucidolytique, ferment propionique-valérianique ; produisant beaucoup d'alcool et d'acétone.

Inflabilis setiensis (1 souche) souche normale.

Inflabilis talis (1 souche), variété non indologène et ne réduisant pas les nitrates en nitrites, non pathogène.

b) PLECTRIDIACÉES. — *Acuformis dubitatus* (2 souches). L'une des 2 souches était normale ; l'autre était la variété lactique.

Plectridium fluxum (1 souche), variété scatologène.

Plectridium caloritolerans (1 souche), normale ; toutefois, sa thermo-résistance ne dépassait pas vingt-cinq minutes à 100° .

Plectridium carnis (3 souches). Toutes trois donnaient de grosses quantités d'indol et de phénol.

c) BACTÉRIACÉES. — *Cillobacterium multiforme* (1 souche). Très fortement gazogène, putride, glucidolytique ; ferment formo-butyro-lactique.

Cillobacterium endocarditis (1 souche) non pathogène, ferment formo-propionique lactique.

Eubacterium foedans (1 souche) normale, réduisant les nitrates en nitrites en présence de nombreux glucides ; ferment formo-propionique lactique.

Eubacterium quartum (1 souche) normale, ferment formo-butyrique lactique.

d) PECTINOLYTIQUES. — *Cl. roseum* (1 souche). Souche normale à grandes spores en flabelle ; température optimum 26° ; peu glucidolytique, peu protéolytique (première souche africaine connue).

Cl. corallinum (3 souches). Peu chromogènes ; deux des souches constituent, l'une la variété *durieuxi*, à colonies irrégulières peu colorées, micro-aérophiles ; l'autre la variété *joncherei*, non glucidolytique mais protéolytique à colonies lenticulaires très colorées [6].

B. — Espèces nouvelles.

De nombreuses espèces anaérobies nouvelles sont à découvrir en Afrique. Cette étude en a révélé 9 sur 42 espèces, soit une proportion de 21 p. 100 par rapport aux espèces connues.

Parmi ces 9 espèces, 3 ont été décrites dans des publications antérieures à ce mémoire, auxquelles nous reportons le lecteur [1, 2, 3]. Nous rappellerons seulement que :

Cl. saturni-rubrum, Prévot 1947 (1 souche) est un *Clostridium* chromogène pectinolytique à colonies rouge-saturne, à température optimum de 26° (à 37° il se décolore et perd son pouvoir pigmentaire), à thermo-résistance faible (une heure à 55°, cinq minutes à 70°), non protéolytique, glucidolytique ; légèrement pathogène ; ferment propionique-valérianique lactique. Pigment soluble dans le benzène et le chloroforme. Pectinolytique dont le pouvoir rouissant est limité au lin, au chanvre et à la rose trémière. Cette espèce rentre dans le troisième sous-genre du genre *Clostridium* (*Cl. felsineum*) où il se différencie aisément des autres espèces (*felsineum*, *roseum*, *haumanni*, *corallinum* et *aurantibutyricum*) par sa morphologie, par la couleur et la nature de son pigment, par son type fermentaire et l'ensemble de ses caractères cultureux.

Inflabilis manganoti Prévot et Zimmès-Chaveron 1947 (2 souches). C'est un *Inflabilis* de taille moyenne, réducteur, à colonies irrégulières ouatées, peu gazogène, fétide, protéolytique, glucidolytique, indologène, scatologène, ferment acéto-valérianique-lactique, non pathogène, qui se distingue des autres espèces protéolytiques et gazogènes du même genre par ses cultures floconneuses et visqueuses et son type fermentaire.

Cillobacterium combesi Prévot et Laplanche 1947 (2 souches, isolées de la forêt primaire de Guinée). C'est un *Cillobacterium* d'assez grande taille, réducteur, gazogène et fétide, protéolytique, non glucidolytique, ferment formo-butyro-valérianique, non pathogène, mais hémolytique *in vitro*, se distinguant facilement des autres espèces du même genre par sa morphologie et ses caractères cultureux et biochimiques.

Les autres espèces nouvelles, au nombre de 6, ont été isolées

par mes collaborateurs Cl. Lanthiez, M. Digeon, L. A. Robin, P. André, J. Laplanche et R. Saissac qui en ont fait l'étude complète. En voici les descriptions :

Plectridium indologenes Lanthiez 1948.

Habitat : Cette espèce a été isolée dans un échantillon de pototo prélevé en Côte d'Ivoire, le long de la piste intercoloniale d'Abidjan à Bamako, entre Toumodi et Danané.

Morphologie : Bâtonnet droit, isolé ou en paires, mesurant 3 à 4 μ de long sur 0,6 μ de large ; mobile dans les cultures très jeunes en milieu liquide dépourvu de glucide ; ses spores sont rares et ne s'observent qu'en milieu neutralisé à la potasse. Ce sont des spores ovales, de grande taille, nettement terminales. Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie strict, il pousse bien à 37°, résiste trois minutes à 100° ; vit plusieurs mois ; très réducteur (rouge neutre et safranine définitivement réduits). pH optimum 7.8.

Caractères cultureux : En gélose profonde, il donne des colonies lenticulaires qui émettent secondairement un ou plusieurs bourgeons. Pas ou peu de gaz.

En eau peptonée, il donne un trouble net et produit de l'indol. En bouillon glucosé, le trouble est très abondant et en quelques jours, il se dépose sous forme d'une phytoglée visqueuse peu cohérente. Odeur putride ; pH final 5.

La gélatine n'est pas liquéfiée.

Le lait n'est pas modifié.

Les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Les glucides suivants sont fermentés : glucose, lactose, galactose.

Pouvoir pathogène : Nul pour le cobaye.

Caractères biochimiques : Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit énormément d'indol et de SH_2 ; l'ammoniaque formé est de 0,112 g. p. 100 cm^3 ; l'acidité volatile est de 0,372 g. p. 100 cm^3 . C'est un mélange d'acide butyrique et formique (2 p. 1). Il produit aussi : acide lactique, amines volatiles, alcools (autres que l'éthanol), acétylméthylcarbinol.

Position dans la systématique : Bâtonnet mobile, Gram-positif à spore terminale, cette espèce appartient au genre *Plectridium*. Au sein de ce genre, il faut le comparer aux espèces gazogènes non protéolytiques, non gélatinolytiques. Il se distingue très facilement des espèces : *carnis*, *gazogenes*, *fluxum*, *tertium* et *caloritolerans* par l'ensemble de ses caractères cultureux. Il se rapproche beaucoup de *Pl. pseudoletanicum*, mais il est plus petit, présente des colonies lenticulaires, produit de l'indol et des acides formique et butyrique.

Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Plectridium indologenes* en raison de la grande quantité d'indol qu'il produit.

Clostridium limosum André 1948.

Habitat : Boue de la lagune Ebrié à Adiopodoumé.

Morphologie : Bâtonnet à bouts arrondis, isolé ou en paires, parfois en courtes chaînettes ; 3 μ sur 0,7 μ ; mobile ; spores subterminales clostridiennes et libres ; Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie strict ; pousse bien à 37° ; résiste dix minutes à 100°. Peu réducteur (rouge neutre partiellement réduit). Longévité supérieure à trois mois.

Cultures : Non gazogènes, fétides.

Gélose profonde : Colonies lenticulaires de petite taille.

Eau peptonée : Culture abondante. Pas d'indol.

Bouillon VF glucosé : Trouble abondant, dépôt ; acidification très faible.

Gélatine : Liquéfiée.

Lait : Digéré en quatre jours.

Protéines coagulées : Non attaquées.

Glucides : Glucose et galactose faiblement fermentés.

Biochimie : Nitrates non réduits ; ni indol, ni scatol ; peu de SH₂ ; beaucoup d'ammoniaque (0,18 g. p. 100) ; acidité volatile totale 0,183 g. p. 100, acides acétique, propionique et lactique ; amines ; alcool.

Pouvoir pathogène : La culture ne provoque aucune lésion chez le cobaye. Dans le filtrat se trouve une hémolysine qui n'est active qu'*in vitro*, au 1/40, neutralisée par les sérums anti-*perfringens* et anti-septicum.

Position dans la systématique : *Clostridium* protéolytique, il appartient au groupe du *Cl. sporogenes*. Non gazogène, il n'est à comparer qu'avec *Cl. histolyticum* dont il se distingue par ses caractères culturels, biochimiques, et l'absence de pouvoir pathogène. Nous lui proposons donc le nom de *Clostridium limosum* n. sp. en raison de son habitat.

Clostridium lacunarum Robin 1948.

Habitat : Boue de la lagune Ebrié à Adiopodoumé, Côte d'Ivoire.

Morphologie : Bâtonnet à bouts arrondis, droit ou incurvé ; isolé ou en paires, ou courtes chaînettes ; 4 μ de long sur 0,9 μ de large. Spores clostridiennes ovalaires de 1,5 μ à 2 μ de long, subterminales. Faiblement mobile ; Gram-positif. Capsules.

Physiologie : Anaérobie microaérophile. Température optimum

37°. Résiste trois minutes à 100°. Longévité supérieure à trois mois. Réducteur (rouge neutre réduit définitivement).

Cultures : Gazogènes, non fétides, mais d'odeur fade.

Gélose profonde : Colonies lenticulaires. Gaz.

Eau peptonée : Léger trouble.

Bouillon VF glucosé : Trouble abondant, dépôt floconneux, rapide, laissant le liquide clair. Odeur fade.

Gélatine : Liquéfiée.

Lait : Non coagulé, non modifié.

Protéines coagulées : Non attaquées.

Glucides : Glucose, lévulose, maltose, lactose, galactose, saccharose fortement fermentés ; mannite faiblement.

Biochimie : Nitrates réduits en nitrites en présence de mannite. Ni indol, ni scatol ; SH_2 ; ammoniacque : 0,017 g. p. 100. Acidité volatile, 0,88 g. p. 100 ; acides formique et propionique ; acide lactique, amines volatiles ; acétone, acétylméthylcarbinol.

Pouvoir pathogène : Nul pour le cobaye. Ni toxine, ni hémolyse.

Position dans la systématique : *Clostridium* non protéolytique, il fait partie du sous-genre du *Cl. fallax*. Il se distingue des espèces antérieurement décrites par son absence de pouvoir pathogène et son type fermentaire. Nous lui proposons le nom de *Cl. lacunarum* n. sp. en raison de son habitat.

Cillobacterium guinaeensis Digeon 1948.

Habitat : Savane du Mont Nimba, en Guinée française.

Morphologie : Bâtonnet à bouts presque carrés, isolé ou en courtes chaînettes ; 2,5 μ à 3 μ sur 0,7 μ . Mobile ; non sporulé, Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie strict ; température optimum 37°. Thermorésistance nulle. Longévité supérieure à trois mois. Très réducteur (rouge neutre et safranine réduits).

Cultures : Gazeuses et fétides.

Gélose profonde : Colonies irrégulières puis arborescentes. Gaz.

Eau peptonée : Trouble ; gaz ; pas d'indol.

Bouillon glucosé : Trouble uniforme. Gaz. Odeur fétide.

Gélatine : Non liquéfiée.

Lait : Non modifié.

Protéines coagulées : Non attaquées.

Glucides : Galactose seul, légèrement fermenté.

Biochimie : Nitrates non réduits en nitrites. Ni indol, ni scatol ; SH_2 ; ammoniacque : 0,06 g. p. 100 ; acidité volatile : 0,162 g. p. 100, acétique et valériannique ; acide lactique. Alcool ; acétylméthylcarbinol.

Pouvoir pathogène : Nul pour le cobaye. Ni toxine, ni hémolyse.

Position dans la systématique. Cette espèce, non sporulée, mobile et Gram-positive appartient au genre *Cillobacterium*. Au sein de ce genre, elle fait partie du groupe non protéolytique et, par conséquent, se rapproche de *Cillobacterium moniliforme* dont elle se distingue par ses colonies irrégulières, son odeur putride, son pouvoir glucidolytique plus faible et plus restreint, son type fermentaire, son absence de pouvoir pathogène. En raison de son habitat, nous lui donnons le nom de *Cillobacterium guinaeensis* n. sp.

Cillobacterium silvestris Lanthiez 1948.

Habitat : Forêt primaire à Daloa, Côte-d'Ivoire.

Morphologie : Bâtonnet court et fin : 1,8 μ sur 0,5 μ ; avec de rares formes longues ; mobile ; encapsulé ; Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie strict. Température optimum 37°. Thermorésistance nulle. Longévité supérieure à trois mois. Très réducteur (rouge neutre et safranine réduits).

Cultures : Gazogènes et fétides.

Gélose profonde : Colonies lenticulaires. Gaz abondant.

Eau peptonée : Trouble très léger.

Bouillon glucosé : Trouble homogène, abondant. Gaz (H₂ et CO₂).

Gélatine : Non liquéfiée.

Lait : Lentement coagulé (un mois).

Protéines coagulées : Non attaquées.

Glucides : Glucose, lévulose, maltose, galactose, saccharose, lactose, sorbite, mannite, amidon et glycérine fermentés très fortement.

Biochimie : Nitrates non réduits en nitrites. Ni indol, ni scatol. SH₂ abondant ; ammoniacque : 0,013 g. p. 100. Acidité volatile : 0,084 g. p. 100, acides acétique et propionique. Acide lactique ; amines volatiles ; alcools ; acétylméthylcarbinol.

Pouvoir pathogène : Nul pour le cobaye. Ni toxine, ni hémolyse.

Position dans la systématique : Au sein du genre *Cillobacterium*, cette espèce fait partie du groupe non protéolytique. Elle se distingue de *C. moniliforme* et de *C. guinaeensis* par la coagulation du lait, le pouvoir glucidolytique plus étendu, le type fermentaire acéto-propionique lactique et l'absence de pouvoir pathogène. Nous lui proposons donc le nom de *Cillobacterium silvestris* n. sp. en raison de son habitat.

Inflabilis litus-eburensis Laplanche et Saissac 1948:

Habitat : Savane inculte à Toumodi (souche A9G) et humus de la région de Man, Côte-d'Ivoire (A25K).

Morphologie : Bâtonnet droit à bouts arrondis, 4 μ à 6 μ de long

sur 1 μ de large ; courtes chaînettes. Immobile, acilié ; spores subterminales clostridiennes et libres. Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie strict. Température optimum 37°. Résiste dix minutes à 100°. Longévité supérieure à six mois. Réducteur (rouge neutre et safranine réduits).

Cultures : Gazogènes et fétides.

Gélose profonde : Colonies ouatées. Gaz.

Eau peptonée : Trouble léger. Gaz.

Bouillon VF glucosé : Trouble abondant. Gaz. Odeur fétide. Dépôt visqueux non cohérent.

Gélatine : Complètement liquéfiée en vingt-quatre heures.

Lait : Coagulé puis digéré en quarante-huit heures.

Sérum coagulé : Partiellement digéré.

Fibrine : Digérée.

Blanc d'œuf coagulé : Non attaqué.

Glucides : Glucose, lévulose, maltose, galactose, sorbite fermentés.

Biochimie : Nitrates non réduits ; ni indol, ni scatol ; SH_2 ; NH_3 ; acides formique, acétique, butyrique et lactique. Amines volatiles ; alcools ; acétone ; acétylméthylcarbinol.

Pouvoir pathogène : Nul pour cobaye et souris. Ni toxine, ni hémolysine.

Systématique : Au sein du genre *Inflabilis*, cette espèce fait partie du groupe protéolytique. Elle se distingue de *I. inflabilis*, *I. talis*, *I. indolicus* et *I. manganoli* par ses colonies ouatées, l'absence d'indol et de phénol, le type fermentaire formo-acéto-butyro-lactique et l'absence de pouvoir pathogène.

Résumé et conclusions.

1° De 60 échantillons de terre d'A. O. F., nous avons isolé 180 souches bactériennes, dont 103 aérobies et 77 anaérobies. Parmi ces dernières, 66 appartenaient à 33 espèces connues et 11 à 9 espèces nouvelles.

2° Sur les 180 souches isolées, 179 étaient Gram-positives et 1 seule Gram-négative (*Serratia piscatoria*, aérobie facultatif). Les bactéries Gram-négatives sont donc très rares dans les sols d'A. O. F.

3° Sur les 77 anaérobies, 7 seulement étaient pathogènes, soit 9 p. 100. Elles répondaient à 5 espèces : *W. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. sardiniensis*, *Cl. hemolyticum* et *Infl. teras*, toutes isolées dans le voisinage des lieux habités où l'origine fécale est probable. Cela explique la rareté des gangrènes en A. O. F. car, outre leur faible densité, elles étaient douées d'un pouvoir pathogène très faible.

4° Parmi les espèces non pathogènes, les trois plus fréquentes

sont *Cl. sporogenes*, *Cl. valerianicum* et *Cl. caproicum*, toutes trois très protéolytiques, trouvées aussi bien dans les terres cultivées que dans les savanes incultes et les forêts non fréquentées. Les autres espèces sont des *Clostridiales* (*Clostridium* et *Inflabilis*), des *Plectridiales* (*Plectridium* et *Acuformis*) et des *Bacteriales* (*Eubacterium* et *Cillobacterium*). Dans l'ensemble, toutes ces souches présentent un métabolisme beaucoup plus actif que celui des souches françaises correspondantes et la proportion des protéolytiques y est considérable.

5° Les pectinolytiques sont bien représentés : 3 souches de *Cl. corallinum* (dont 2 variétés nouvelles) ; 1 souche de *Cl. roseum* et 1 souche d'une espèce nouvelle : *Cl. saturni-rubrum*.

6° Les espèces phénologiques ne sont pas rares : 7 souches appartenant à 4 espèces : *Pl. carnis*, *A. dubitatus*, *Cl. tonkinensis*, *Cl. butyricum*. Une souche de *Cl. corallinum* produisait du *p.* crésol.

7° Neuf espèces nouvelles ont été isolées : *Inflabilis mangeloti*, *Cillobacterium combesi*, *Cl. saturni-rubrum*, *Pl. indologenes*, *Cl. lacunarum*, *Cl. limosum*, *Cl. silvestris*, *Cl. guinaensis* et *Infl. litus-eburensis*.

8° Nous n'avons trouvé qu'un seul échantillon de terre absolument stérile : il avait été prélevé dans une savane ayant subi un feu de brousse récent en vue du défrichement. La pratique du feu de brousse est donc néfaste puisqu'elle prive le sol de ses éléments de fertilisation biologique.

9° La question des zones d'auto-stérilisation du sol a été abordée ; cette auto-stérilisation n'existe que pour les végétaux supérieurs : la densité bactérienne y est exactement la même que celle des échantillons-témoins prélevés dans le voisinage et les espèces bactériennes y sont les mêmes.

10° Cette étude n'est qu'une introduction à l'étude des sols tropicaux et équatoriaux où de nombreux problèmes de pédologie restent à résoudre. Toutefois, il semble bien que l'absence d'humus dans les savanes et forêts de plaine soit due à l'intensité du métabolisme bactérien qui détruit très rapidement toute la matière organique à la surface du sol, fait dû beaucoup plus à la température élevée et à l'humidité qu'à l'activité intrinsèque des bactéries car, en montagne, où la température est beaucoup plus basse, on rencontre les mêmes espèces bactériennes alors que l'humus est très abondant.

Nous remercions très vivement M. le professeur Combes qui a rendu possible cette prospection des sols coloniaux, M. le professeur Mangenot qui nous a aidé très efficacement en Côte-d'Ivoire et en Guinée, le médecin-général Durieux et le médecin-colonel Jonchère qui nous ont aimablement reçu et guidé au Sénégal.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A. R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 1035.
- [2] PRÉVOT (A. R.) et J. ZIMMÈS-CHAUVEROU. *Ces Annales*, 1947, **73**, 602.
- [3] PRÉVOT (A. R.) et J. LAPLANCHE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 687.
- [4] PRÉVOT (A. R.). *Manuel de classification des Anaérobies*, 2^e édit., Masson édit., Paris, 1948.
- [5] POCHON et TCHAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 903.
- [6] PRÉVOT (A. R.) et SANSONNENS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1044.

TECHNIQUE DU MAINTIEN DE LA FAIBLE VIRULENCE DU BCG. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET CRITIQUE A PROPOS DE TRAVAUX DANOIS

par F. VAN DEINSE et M^{lle} A. PETROVA (*).

Dans un mémoire décrivant la pratique de la vaccination au BCG au Danemark et publié en 1946, K. A. Jensen [1] relate les vicissitudes de la virulence de la souche BCG dont on se servait à l'Institut de Sérologie de l'État à Copenhague pour la préparation du vaccin. Et, la même année, J. Holm [2], successeur de Jensen au Service de la Tuberculose de cet Institut, dans un rapport sur les vaccinations au BCG au Danemark aux *Public Health Reports* précise que le mode d'entretien de la souche, suivi à Copenhague, qui consistait en des repiquages, tous les quinze jours, sur milieu synthétique de Sauton, amenait périodiquement une diminution de la faible virulence du BCG. On pouvait se rendre compte de cette diminution de virulence par la diminution du pourcentage des réactions positives à la tuberculine parmi les sujets vaccinés. Il suffisait alors, dit Holm, de remettre la souche sur pomme de terre biliée, pendant plusieurs passages, pour obtenir le retour au degré de virulence initial. Depuis quelques années, d'ailleurs, on a abandonné cette méthode de l'intercalage de cultures sur bile, et il suffit de réensemencer la culture plus fréquemment (tous les huit jours) sur Sauton, pour obtenir la constance de la virulence.

Ces affirmations des auteurs danois ont suscité, dans notre esprit, deux observations. En premier lieu, celle-ci : le milieu de Sauton est impropre à l'entretien des souches de BCG et de toutes autres souches de bacilles tuberculeux. Calmette et Guérin ont expressément recommandé d'entretenir le BCG sur pomme de terre au Sauton, avec, au début, de temps en temps un passage sur bile, *pour maintenir la non virulence* : ces passages sur pomme de terre biliée ont été, par la suite, abandonnés comme inutiles.

La deuxième observation découle de ce qui vient d'être dit : étant donné que le milieu bilié a servi à l'affaiblissement de

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 janvier 1948.

la souche, pour donner, après treize années d'entretien sur ce milieu, la souche non virulente qu'est le BCG, il semble paradoxal que les auteurs danois se soient précisément servis de la pomme de terre biliée pour obtenir ce léger regain de virulence dont le BCG a besoin pour ne pas perdre son pouvoir antigène.

Comme Jensen et Holm l'ont aujourd'hui autorité sur le sujet de la vaccination au BCG, autorité bien fondée, vu le très grand effort suscité par eux dans les pays scandinaves et ailleurs pour la généralisation de cette vaccination, et la minutie avec laquelle ils en ont étudié les modalités, il nous a semblé nécessaire de contrôler leurs dires par des expériences. C'était d'autant plus indispensable que les Danois sont aujourd'hui considérés comme des techniciens du BCG, et que nous ne pouvons pas ne pas tenir compte de cette réputation.

Pour vérifier le degré de cette faible virulence que le BCG doit maintenir, pour pouvoir exercer son pouvoir prémunisant contre la tuberculose, on ne peut pas se contenter de l'inoculation de doses massives au cobaye par la voie sous-cutanée, comme nous le faisons de façon courante pour montrer que le BCG reste toujours non pathogène. Il s'agit, en effet, de nuances plutôt que de changements de virulence grossiers. Pour mettre en évidence ces nuances, il faut recourir à l'inoculation de toutes petites doses par la voie intradermique. C'est de ces inoculations dont nous nous servons pour contrôler chez notre souche mère le maintien de cette trace de virulence faible mais indispensable pour sauvegarder le pouvoir antigène de notre souche.

Notre souche BCG, que nous entretenons par réensemencements, tous les quinze jours, sur pomme de terre au Sauton, provoque, inoculée dans le derme du cobaye à la dose de 0,01 mg., exceptionnellement à la dose de 0,001 mg., la formation d'un petit nodule avec ou sans escarre en l'espace d'une ou deux semaines, d'après la sensibilité individuelle de l'animal, nodule qui disparaît après une durée de huit à quinze jours, d'après son importance.

Nous avons donc réensemencé notre BCG sur pomme de terre biliée, et inoculé 5 cobayes, par voie intradermique, à quatre endroits différents, deux à gauche et deux à droite, avec des doses de 0,01 et 0,0001 mg. respectivement de la culture biliée âgée de vingt-sept jours et d'une culture sur pomme de terre au Sauton (milieu habituel) du même âge. La dose de 0,01 mg. de bacilles biliés a provoqué, chez tous les 5 cobayes, la formation précoce d'un nodule (en huit jours environ), avec escarre et, chez deux d'entre eux, avec chancre, et tous ont mis plus d'un mois à guérir de cette lésion locale qui, bien entendu, ne s'est point étendue. Chez trois d'entre ces cinq premiers cobayes, même la dose de 0,0001 mg. de bacilles biliés a pu provoquer la formation tardive

(quinze à vingt-deux jours) d'un nodule sans escarre. La culture ordinaire n'a fait apparaître des nodules sans escarre que chez deux de ces cobayes, et à la dose de 0,01 mg. seulement, le dix-neuvième jour, redisparaissant en dix à quinze jours. Il est probable que, la culture usagée étant déjà assez vieille, la suspension contenait beaucoup de bacilles morts. La violence de la réaction provoquée par la culture sur bile n'en était que plus remarquable.

Nous avons continué à réensemencer notre BCG sur pomme de terre biliée, et, de chaque passage, nous réensemencions une pomme de terre ordinaire. Quatre cobayes furent alors inoculés, par voie intradermique, toujours à quatre endroits différents, avec du BCG ordinaire, avec une culture ayant fait 3, 4 et 5 passages sur bile respectivement et réensemencée sur pomme de terre ordinaire, aux mêmes conditions que pour la série précédente. Cette fois-ci, il n'y eût aucune différence entre les réactions provoquées par ces différentes cultures.

Quatre autres cobayes reçurent, à deux endroits différents, une injection intradermique de 0,01 mg. de BCG ayant fait un passage sur bile et, ensuite, un passage sur pomme de terre ordinaire, et de 0,01 mg. de BCG entretenu depuis des années sur la seule pomme de terre ordinaire. Il n'y eût, entre ces deux séries d'inoculations, aucune différence quant à la réaction qu'elles provoquèrent.

Finalement, nous avons préparé trois suspensions, en partant d'une culture de BCG sur pomme de terre au Sauton : une dans de l'eau physiologique contenant 10 p. 100 de bile de bœuf, une deuxième préparée au moyen de perles de verre dans un flacon et une troisième finement broyée dans un mortier d'agate. Les cultures mélangées de bile donnant des suspensions plus finement dispersées, nous avons cru bien faire en préparant cette suspension au mortier d'agate pour exclure l'influence de la dispersion des bacilles dans une suspension comme cause d'une réaction plus violente.

Ces deux dernières suspensions furent préparées avec de l'eau physiologique sans bile. Six cobayes furent inoculés avec ces trois suspensions, à trois endroits différents du corps, à la dose de 0,01 mg.

Ces inoculations nous ont montré d'abord que l'état plus ou moins parfait de dispersion des bacilles dans les suspensions n'a pas d'influence notable sur la précocité ou l'intensité des réactions que provoque l'injection intradermique chez nos cobayes. Mais la suspension contenant la bile a provoqué, chez tous les 6 cobayes, une réaction violente précoce, apparaissant dès le lendemain, se traduisant par la formation d'un nodule avec escarre et point nécrotique au centre. Ces réactions disparaissent en même temps que celles provoquées par les suspensions bacillaires non biliées,

apparues plus tardivement, après les délais habituels : huit à quinze jours.

Si donc les injections de bacilles développés sur pomme de terre biliée ont donné, dans notre première série d'expériences, une réaction si nettement plus forte que les injections de bacilles provenant d'une culture ordinaire, il est infiniment probable que ce phénomène soit dû à ce que les cultures sur pomme de terre biliée sont imprégnées de bile, et que celle-ci a un pouvoir irritant prononcé sur le derme. Dès que ces bacilles sont cultivés de nouveau sur leur milieu habituel, il ne reste aucune trace de ce pouvoir que montrait la culture biliée de provoquer de fortes réactions.

Nous ajoutons, à titre documentaire, que nous avons pratiqué des inoculations intradermiques chez 6 cobayes, avec une culture BCG de Copenhague (n° 819, gracieusement envoyée par Orskov) et une culture BCG de l'Institut Pasteur. La culture danoise était un ensemenement sur Löwenstein, la nôtre sur pomme de terre au Sauton (n° 826). Les animaux reçurent sur le flanc gauche 0,01 mg. de la souche danoise et sur le flanc droit, 0,01 mg. de la souche française. Ces inoculations comparatives ont montré qu'il n'existait aucune différence de virulence entre la souche BCG de l'Institut Pasteur et la souche de l'Institut de Sérologie de l'Etat de Copenhague.

CONCLUSIONS.

Nous devons conclure de nos recherches, que nous n'avons pas pu confirmer cette opinion des auteurs danois d'après laquelle il suffirait de faire passer la culture BCG un certain nombre de fois sur pomme de terre biliée pour augmenter sa faible virulence.

Nous devons ajouter qu'avec la technique définie à l'Institut Pasteur de Paris, nous n'avons jamais observé la prétendue chute de virulence, signalée par ces mêmes auteurs danois, et qui nous semble être plutôt une chute de vitalité due au milieu de Sauton, mal approprié à l'entretien des cultures.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JENSEN (K. A.), *Acta Tuberc. Scand.*, 1946, 20, 1.
- [2] HOLM (J.), *Public Health Rep.*, 1946, 61, 1298.

LA LYSE DES CULTURES DE BACILLES TUBERCULEUX SUR POMME DE TERRE A L'EAU GLYCÉRINÉE ET LA LYSE DES BACILLES TUBERCULEUX MORTS EN SUSPENSION AQUEUSE A L'ABRI DE L'AIR A 38°

par F. van DEINSE (*).

Je voudrais aujourd'hui attirer votre attention sur un phénomène de lyse, qui se produit dans des cultures de bacilles tuberculeux sur pomme de terre à l'eau glycinée quand on les laisse trop longtemps à l'étuve. Le cas s'est produit au moment de la libération de Paris, quand nous avons été, pendant un certain temps, dans l'impossibilité de venir au laboratoire. A la reprise du travail, nous avons eu la surprise de voir que certaines de nos cultures sur pomme de terre à l'eau glycinée, restées à l'étuve depuis deux mois sans être repiquées, avaient pris un aspect humide, crémeux. Elles semblaient être en lyse.

Nous nous sommes attaché à étudier ce phénomène sur plusieurs cultures de bacilles tuberculeux différentes, et voici, brièvement résumés, les résultats de cette étude.

Cette lyse se produit sur la pomme de terre à l'eau glycinée, jamais ou presque jamais sur pomme de terre au bouillon glyciné et elle ne frappe que les cultures de type humain ; les cultures bovines ne subissent la lyse que tout à fait exceptionnellement. Par contre les bacilles bovins qui ont subi un grand nombre de passages sur pomme de terre billée, comme notre souche Gué. 134 ou le BCG, se lysent sur pomme de terre à l'eau glycinée, comme des cultures humaines.

Quand on ajoute à l'eau glycinée 1 p. 100 de peptone, la lyse sur pomme de terre se fait plus tardivement, mais elle a lieu sans exception pour les bacilles de type humain.

Sur pomme de terre au Sauton, milieu qui sert à l'entretien de notre souche BCG, la lyse n'a pas lieu.

On n'observe pas non plus de lyse sur milieu de l'œuf de Löwenstein, ni sur les milieux synthétiques de Sauton ou de Long.

Les cultures humaines, susceptibles d'être lysées sur la pomme de terre à l'eau glycinée, ne subissent pas toutes cette lyse au

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 février 1948.

même moment : les délais sont variables d'une souche à l'autre, l'une se lysant dès le deuxième mois après l'ensemencement, d'autres gardant leur aspect sec bien plus longtemps.

Quand la lyse est très avancée, il se forme sur la surface de la culture quelques colonies secondaires, de couleur différente : la partie ancienne et lysée étant souvent de couleur ocre, les colonies secondaires se présentant sous forme de choux-fleurs blancs.

Sur les frottis colorés au Ziehl, la culture lysée se montre composée d'éléments finement granulaires, cyanophiles, dans lesquels se trouvent de rares éléments acido-résistants. Ces derniers ne manquent jamais tout à fait, même dans les très vieilles cultures (deux ans).

Aux réensemencements, la partie lysée, quand elle est trop vieille, ne donne plus de nouvelle culture, mais les colonies secondaires, composées en grande partie de bacilles d'aspect normal, donnent d'abondantes cultures au repiquage, qui se lysent à leur tour sur pomme de terre à l'eau glycérinée, refont des colonies secondaires, et ainsi de suite.

Nous avons cru, au début, avoir affaire à une autolyse accélérée et intensifiée, du genre si bien décrit par R. Laporte (1). Mais il ne semble pas qu'il en soit ainsi. Car nous avons vu la liquéfaction macroscopique des cultures se produire également dans des tubes scellés, dans lesquels nous avons fait le vide, et dans d'autres tubes contenant des cultures tuées par chauffage.

Dans ces cultures chauffées, il se produit d'ailleurs une sorte de lyse macroscopique, comme une liquéfaction, même sur pomme de terre au bouillon glycériné, et même pour des cultures bovines. Mais sur les frottis de ces cultures mortes, on voit que les bacilles sont en grande partie encore acido-résistants, malgré l'aspect lysé de la culture, et la substance granulaire cyanophile apparaît beaucoup plus tard, plusieurs semaines après.

Nous avons, d'autre part, enfermé, à l'abri de l'air, dans des ampoules scellées, des suspensions dans l'eau distillée de bacilles tuberculeux humains ou bovins morts par chauffage. Après un séjour à 38° de ces ampoules de plusieurs semaines pour les bacilles tuberculeux humains, et de plusieurs mois pour les bacilles tuberculeux bovins nous avons pu constater qu'il s'était produit une désagrégation, une lyse quasi-complète des bacilles contenus dans ces ampoules, à tel point qu'on ne trouve plus, à la longue, aucun élément acido-résistant dans ces ampoules. Les mêmes suspensions, laissées à l'étuve, non dans des ampoules scellées, mais dans des ballons simplement bouchés au coton et au papier, donc pas à l'abri de l'air, contiennent encore des élé-

(1) Ces Annales, 1943, 69, 262.

ments en grande partie bacillaires acido-résistants, quand dans les ampoules on ne trouve plus aucun bacille acido-résistant, mais uniquement de la substance granulaire cyanophile, ou quelques amas de granules acido-résistants.

Or, quand on suspend, dans l'eau distillée, ces cultures sur pomme de terre à l'eau glycinée chauffées qui, comme nous l'avons dit, prennent assez rapidement un aspect humide alors que les bacilles morts qui les composent gardent encore longtemps un aspect normal, et qu'on place cette suspension à l'étuve, enfermée dans des ampoules scellées donc à l'abri de l'air, on constate que les bacilles se désagrègent, se lysent beaucoup plus rapidement que ceux qui sont restés sur la pomme de terre.

Tout ceci montre qu'il ne s'agit pas, dans les phénomènes que nous décrivons, d'une autolyse par les ferments endo-bacillaires, telle que l'a décrite Laporte, car cette autolyse ne peut se faire à l'abri de l'air, et non plus après chauffage des bacilles.

Il semble s'agir d'une hydrolyse, favorisée d'une part par la pomme de terre, d'autre part par l'absence d'air. Cette hydrolyse semble être freinée par la peptone, et empêchée par le bouillon de veau et le Sauton, puisqu'elle ne se produit à peu près jamais sur pomme de terre au bouillon glyciné ou au Sauton. Il y a lieu, toutefois, de distinguer la lyse apparente, la liquéfaction qui se voit à l'œil nu sur les vieilles cultures sur pomme de terre à l'eau, et la lyse microscopique des corps bacillaires, puisque, sur culture chauffée, la dernière est nettement retardée, alors que la première semble être plutôt accélérée.

Nous avons voulu vérifier le pouvoir pathogène de ces vieilles cultures humaines lysées. Nous avons donc fait des inoculations au cobaye de doses importantes (0,1 à 2 mg.) par voie sous-cutanée de 4 souches humaines vieilles et lysées et d'une culture bovine biliée (Gué. 134^e passage sur pomme de terre biliée) encore virulente, mais facilement lysable sur la pomme de terre à l'eau glycinée. Voici ce que ces inoculations nous ont appris.

Parmi ces souches humaines il y en a deux qui possèdent, même à l'état frais, une virulence assez faible. L'une d'elles, la souche Ro., âgée de deux mois et déjà en pleine lyse, a tuberculisé un cobaye, inoculé avec 0,1 mg., mais cet animal est mort après vingt mois, et présentait des lésions tuberculeuses discrètes. L'ensemencement de ses organes a donné quelques colonies rugueuses, d'aspect normal. Une culture Ro., âgée de cinq mois et demi, lysée, fut inoculée à la dose de 2 mg. à un cobaye, qui est mort, quatorze mois après, cachectique, et présentant des lésions non spécifiques d'intoxication grave notamment une forte stéatose du foie. Des colonies secondaires formées sur cette même culture ont tuberculisé un cobaye (dose 2 mg.), mais cet animal n'est mort qu'après seize mois, présentant des lésions spécifiques

discrètes ; un deuxième cobaye, mort après sept mois et demi, n'avait aucune lésion tuberculeuse, et l'ensemencement de ses organes est resté négatif. Enfin une culture Ro., âgée de qua-

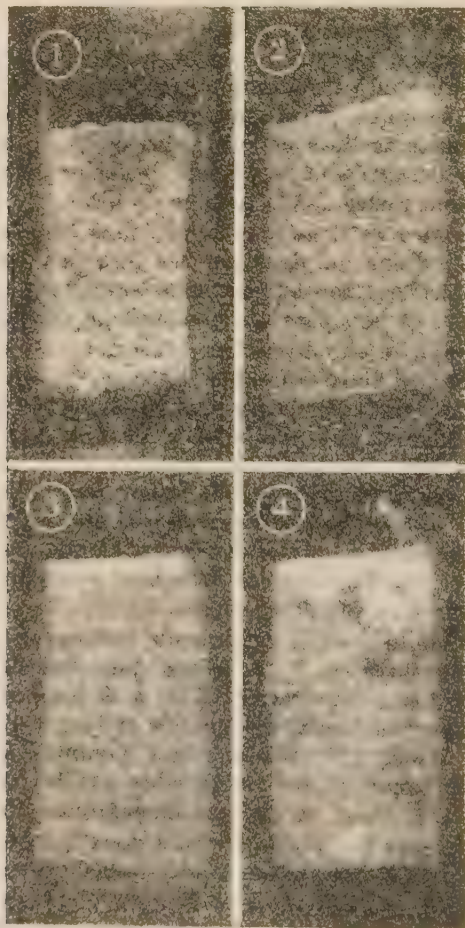


FIG. 1. — Culture humaine « Ja » sur pomme de terre au bouillon glycérimé. Aucune lyse malgré six mois de séjour à 38°. (Photos Jeantet, Institut Pasteur.)

FIG. 2. — Culture humaine « Ja » sur pomme de terre à l'eau glycérimée. Pleine lyse ; six mois de séjour à 38°.

FIG. 3. — Culture humaine « Ja » sur pomme de terre à l'eau glycérimée. Chauffée trente minutes à 105° à l'âge de quatorze jours : pleine lyse huit jours après.

FIG. 4. — Culture humaine « Mir » sur pomme de terre à l'eau glycérimée, âgée de six mois. Lyse et colonies secondaires.

torze mois, complètement lysée, inoculée à la dose de 1 mg. à deux cobayes, n'a pas tuberculisé ces animaux. Pour ne pas allonger outre mesure cette communication, disons que l'autre souche humaine faiblement virulente, la souche Ja., après trois et neuf mois de lyse, respectivement, n'a pas tuberculisé les cobayes, mais qu'une culture de dix-huit mois de cette même souche, complètement lysée, a provoqué, chez un seul sur trois cobayes, quelques granulations aux pommions, et chez le deuxième une stéatose généralisée du foie sans lésions spécifiques. Seul l'animal porteur de granulations pulmonaires a donné, à l'ensemencement de ses organes, quelques colonies d'aspect normal.

La troisième souche humaine, la souche Mir., virulente celle-là, âgée de trois mois, et malgré l'état de lyse, a tuberculisé 2 cobayes à la dose de 0,1 mg. (survies de quatre et onze mois respectivement). A l'âge de neuf mois, elle a encore tuberculisé deux cobayes (survie neuf et dix mois). A l'âge de quinze mois, elle a tuberculisé un cobaye sur deux, à dix-huit mois même résultat (mais les ensemencements des organes du cobaye négatif ont donné de nombreuses colonies d'aspect normal), et à l'âge de dix-neuf mois la culture Mir. lysée s'est enfin montrée incapable de tuberculiser le cobaye.

La quatrième souche humaine, la plus récemment isolée (d'une tuberculose rénale) et la plus virulente, a rapidement tuberculisé tous les cobayes inoculés, jusqu'à l'âge de onze mois.

Enfin la souche bovine billée virulente, Gué. 134, complètement lysée et âgée de treize mois, a encore rapidement tuberculisé les cobayes.

Nous croyons pouvoir dégager les conclusions suivantes des résultats de ces inoculations. Nous avons déjà dit plus haut que, même dans les cultures les plus vieilles et les plus lysées il se trouve encore quelques éléments bacillaires acido-résistants noyés dans la masse de substance cyanophile provenant de la lyse. Ce sont, probablement, ces rares éléments qui, porteurs de la virulence de la souche, tuberculisent les cobayes, réalisant chez ces animaux des infections paucibacillaires. Or, nous savons que plus une culture de bacilles tuberculeux est virulente, plus le nombre des bacilles peut être réduit, capable de provoquer une tuberculose paucibacillaire chez le cobaye. J. Bretey et J. Browaëys ont montré que, pour une culture de bacilles tuberculeux virulente, les infections paucibacillaires peuvent évoluer rapidement (2). C'est ce qui s'est passé pour nos cultures lysées. En effet, moins la souche est virulente, plus longues sont les survies, même chez les cobayes qui finissent par faire quelques lésions spécifiques. Les deux dernières cultures, malgré l'état de lyse très avancé dans

laquelle elles se trouvaient, ont rapidement tuberculisé les cobayes (survies de un à trois mois).

Les rares unités bacillaires qui ont échappé à la lyse ne sont cependant pas les seuls éléments pathogènes de ces cultures lysées ; il semble que, dans certains cas, la masse lysée cyanophile elle-même exerce une action nocive sur le cobaye, et nous avons vu des cobayes mourir sans lésions spécifiquement tuberculeuses, mais porteurs de signes histologiques témoins d'une intoxication chronique, dont une stéatose importante du foie est le principal.

Ces vieilles cultures lysées gardent, malgré leur pouvoir pathogène réduit, une activité allergisante : 17 cobayes, inoculés avec 1 mg. de ces cultures réagirent, en général, fortement à la tuberculine deux mois après l'inoculation ; exceptionnellement, l'allergie, négative après deux mois, s'est manifestée ultérieurement : après cinq ou même huit mois seulement. Les cultures inoculées étaient toutes âgées de quatorze à vingt et un mois, donc dans un état de lyse très avancée. Il s'agissait des trois cultures humaines Ro., Ja. et Mir., dont les deux premières sont peu virulentes ; même à l'état normal. L'allergisation du cobaye ne semble donc pas avoir été fonction, dans ces expériences, du degré de virulence de la culture, ni d'un nombre élevé de bacilles intacts, vu l'âge de ces cultures.

Parmi ces cobayes inoculés avec de vieilles cultures lysées, 4 furent éprouvés, en outre, avec le contenu d'ampoules scellées remplies de suspensions de bacilles humains ou bovins dans de l'eau distillée et chauffées, totalement lysées après un séjour de deux ans à l'étuve. Ces suspensions ont déclenché, sans exception, de fortes réactions nécrotiques chez ces cobayes allergiques.

Il s'ensuit que les vieilles suspensions lysées de bacilles tuberculeux morts se comportent comme de la tuberculine.

Finalement, nous avons inoculé 11 cobayes avec le contenu d'ampoules scellées, remplies de bacilles tuberculeux humains chauffés, bovins ou aviaires en suspension dans de l'eau distillée, et totalement lysés par un séjour prolongé à l'étuve à 38° s'échelonnant entre neuf et trente-huit mois. Parmi ces 11 cobayes, 3 seulement ont réagi très faiblement à la tuberculine après deux mois environ, les autres sont restés insensibles à la tuberculine. Ceci montre que la lyse profonde des bacilles tuberculeux morts, telle qu'elle se produit en suspension aqueuse dans des ampoules scellées à 38°, détruit le pouvoir allergisant des masses bacillaires mortes en lyse, probablement par une désagrégation trop poussée des protéides bacillaires, alors que sur les vieilles cultures vivantes, malgré une lyse avancée, le pouvoir allergisant reste longtemps intact.

En résumant nos expériences, nous pouvons dire que les 4

souches de bacilles tuberculeux humains dont nous nous sommes servi, ainsi que des souches bovines ayant fait de très nombreux passages sur la pomme de terre biliée, comme le BCG et notre souche Gué. 134, se lysent facilement sur pomme de terre à l'eau glycérolisée, mais que de rares éléments bacillaires restent intacts au milieu de la masse lysée, et peuvent, dans le cas de souches virulentes, déclencher des tuberculoses paucibacillaires chez le cobaye, évoluant d'autant plus lentement que les souches en question sont moins virulentes. Dépassé un certain degré de lyse il n'y a plus formation de lésions spécifiques chez le cobaye, mais il peut encore y avoir chez l'animal inoculé, des effets toxiques, se traduisant notamment par une stéatose importante du foie. Les cultures lysées gardent un pouvoir allergisant prononcé pour le cobaye, mais cette allergie peut se manifester tardivement. Des suspensions dans de l'eau distillée de bacilles tuberculeux tués par chauffage, enfermés dans des ampoules scellées, donc à l'abri de l'air, et placées à 38°, se lysent complètement en quelques semaines quand il s'agit de bacilles humains, et en quelques mois pour le bacille bovin. Ces suspensions lysées déclenchent des intradermo-reactions fortement positives chez le cobaye allergique, mais sont elles-mêmes à peu près incapables d'allergiser le cobaye. Elles se comportent, par conséquent, comme de la tuberculine.

RECHERCHES SUR LE CYCLE MORPHOLOGIQUE ET L'APPAREIL NUCLÉAIRE DES *AZOTOBACTER*

par J. POCHON, Y. T. TCHAN et T. L. WANG.

(Institut Pasteur.)

Les espèces du genre *Azotobacter* présentent un cycle morphologique assez complexe. Les premiers auteurs qui avaient étudié cette question avaient même noté l'apparition plus ou moins brusque, au cours des cultures en milieux liquides, de formes tout à fait aberrantes et, pour les faire rentrer dans le cycle évolutif, avaient été amenés à compliquer celui-ci et à décrire jusqu'à sept stades successifs et cinq types de reproduction (Löhnis et Smith [1]). En reprenant cette étude et par une critique serrée des techniques utilisées, Winogradsky [2] montra ensuite que ces auteurs avaient vraisemblablement travaillé avec des cultures mixtes et que l'apparition des formes très aberrantes correspondait en réalité à la « sortie », au cours des cultures, de germes contaminants latents. Il n'en reste pas moins vrai que le cycle évolutif des différentes espèces, tel qu'il a été décrit par Winogradsky, et confirmé dans le présent travail, reste relativement complexe.

Il nous a semblé intéressant, sur ce matériel de choix, de suivre l'évolution de l'appareil chromatique, nucléaire, pour employer la terminologie correspondant à la tendance actuelle des bactério-cytologistes modernes. Rappelons que le cycle morphologique, tel qu'il a été décrit par Winogradsky, et que nous avons vérifié, est différent chez *A. chroococcum* et *A. vinelandii*, d'une part, et chez *A. agilis*, d'autre part.

Dans les deux premières espèces il peut être ramené au schéma suivant :

Cellules jeunes en bâtonnet trapu, mobile, cilié ;

Cellules adultes, ovalaires, immobiles ;

Cellules âgées, plus petites, immobiles.

L'évolution peut ensuite se faire dans deux directions différentes. Cette différence d'évolution avait été attribuée par Winogradsky [3] aux matières énergétiques fournies comme aliments aux cellules. Evolution normale vers l'enkystement avec les aliments « normaux » des *Azotobacter* dans le sol (alcools, acides

volatils et fixes...), évolution anormale avec les aliments « anormaux » (mannitol, sucres...); nous exposerons plus loin les modifications qui semblent devoir être apportées à ce déterminisme.

Quoi qu'il en soit, l'évolution normale vers l'enkystement est caractérisée par une contraction de la cellule qui s'entoure d'une membrane kystique à double paroi épaisse; lors de la germination de ces kystes on note d'abord un accollement du corps protoplasmique central à la paroi; puis cette paroi se perfore, le corps central fait hernie par cet orifice, puis sort sous forme d'un coccocde très petit qui s'allonge, grandit pour redonner la forme bacillaire, initiale, des cellules jeunes. L'évolution anormale est au contraire caractérisée par l'apparition de formes géantes bourgeonnantes, analogues à des levures. Les quelques cellules qui parviennent à l'enkystement donnent des kystes géants, à contenu clair, peu colorable, et incapables de germination.

Dans l'espèce *A. agilis* l'évolution morphologique est différente: normalement la cellule jeune est ovale, très grande et mobile; puis elle s'allonge, s'étrangle en son centre et se divise en deux cellules filles. A la fin de la culture les cellules restent avec la même morphologie, à l'état de vie latente, sans jamais s'enkyster. L'évolution « anormale » déterminée, pour Wino-gradsky, par les mêmes facteurs nutritifs, se traduit, comme celle des espèces précédentes, par l'apparition de cellules géantes et bourgeonnantes.

Nous avons repris cette étude avec les techniques suivantes:

Culture sur milieux liquides (milieu salin standard de Wino-gradsky additionné de butanol comme aliment normal ou de glucose comme aliment anormal) ou sur milieux solides (soit gélose dialysée, soit gel de silice, additionné de la solution saline et des mêmes aliments). Avec les cultures en milieux liquides on prélevait une gouttelette déposée sur lame, avec celles sur milieux solides on prélevait un petit fragment de gélose ou de silico-gel qui servait pour faire une impression sur lame; la fixation était faite, à l'état humide, par les vapeurs d'acide osmique. Les préparations fixées étaient traitées par la méthode de Robinow [4]: immersion dans l'acide chlorhydrique normal (la normalité de l'acide nous a paru importante) à 60°, pendant sept à soixante minutes (la durée de l'hydrolyse nous a paru par contre d'importance secondaire). Puis on colorait soit par le Giemsa classique, soit par l'hématoxyline ferrique régressive (la régression était obtenue par l'acide picrique en solution alcoolique à demi-saturation), sans surcoloration (nous avons essayé sans gain appréciable, la surcoloration par l'éosine ou le vert de Paris).

Dans ces conditions nous avons mis en évidence des granulations colorables en bleu par le Giemsa ou en noir par l'héma-

toxyline, dont la répartition, la division et le cycle évolutif laissent à penser qu'il s'agit d'un appareil nucléaire en raison de la corrélation étroite de ce cycle et du cycle évolutif de la cellule elle-même. Il va sans dire que dans une même préparation on note toujours la présence simultanée de formes à des stades différents de leur évolution de croissance et cytologique, si bien qu'il y a toujours une part d'interprétation dans la description de ces cycles ; voici celle que nous proposons :

STADES DE CROISSANCE ET DE DIVISION. — Ils sont identiques dans les trois espèces que nous avons étudiées : *A. chroococcum*, *A. vinelandii* et *A. agilis*. Cellules jeunes plus ou moins ovalaires ou en court bâtonnet présentant deux granules polaires plus ou moins bien différenciés ; puis ces granules s'individualisent plus nettement, deviennent franchement polaires en même temps que



SCHEMA 1. — *A. vinelandii*. Croissance et division.

s'ébauche leur division ; cette division se complète en même temps que la cellule s'allonge ; celle-ci présente bientôt deux paires de granules polaires ; chacun de ces grains s'allonge et s'étrangle peu à peu, puis se divise en deux, si bien que la cellule qui s'est encore allongée et commence elle-même à s'étrangler présente alors 8 granulations en deux groupes de 4. La cellule se divise alors en deux cellules filles dont les 4 grains se fusionnent plus ou moins en un anneau ou en une masse à contour plus ou moins bien défini ; finalement tout le contenu cellulaire se colore en bleu par le Giemsa, sans qu'il soit possible de définir une morphologie chromatique nette. Puis la teinte bleue redevient plus distincte aux deux pôles, s'y différencie en granule et le cycle recommence (voir schéma 1 et n° 1 de la figure).

EVOLUTION VERS L'ENKYSTEMENT. — Elle est propre aux espèces *A. chroococcum* et *A. vinelandii* et assez semblable chez les deux. La cellule au stade 7 du schéma 1, à structure chromatique indifférenciée, diminue de volume (Nannocyte de Winogradsky) et la masse chromatique semble également se contracter en un granule central ou périphérique, dans ce cas parfois allongé en demi-anneau. Puis ce grain se divise en deux, parfois en trois ou en quatre granules sans qu'il y ait la moindre ébauche

de division cellulaire : au contraire la cellule s'entoure d'une coque d'épaisseur croissante, la membrane kystique. Les granules se fusionnent plus ou moins en même temps que l'épaississement considérable de la coque rend tout examen de la structure interne très difficile (voir schéma 2 et n° 2 de la figure).



SCHÉMA 2. — *A. vinelandii*. Différents stades de l'enkystement.

GERMINATION DES KYSTES. — Un granule chromatique central ou paracentral devient net ; il se divise en deux puis en quatre en même temps que se différencie à l'intérieur du kyste un corpuscule cytoplasmique allongé où ces granules apparaissent en deux groupes polaires ; une extrémité du corpuscule cytoplasmique allongé vient s'appuyer sur la paroi du kyste ; par une



SCHÉMA 3. — *A. chroococcum*. Germination d'un kyste.

déhiscence localisée de cette paroi, le corpuscule fait hernie, saille de plus en plus et sort du kyste sous forme d'un court bâtonnet à deux paires de granules polaires (voir schéma 3 et n° 3 de la figure).

EVOLUTION ANORMALE. — Elle est un peu différente chez *A. agilis* et chez *A. chroococcum*.

Chez *A. agilis*, au stade à 4 granules on voit succéder un stade à 8 granules sans division cellulaire ; les granules se répartissent irrégulièrement dans le protoplasme ; les uns disparaissent, d'autres apparaissent, si bien que le nombre en est tout à fait variable, en même temps que la cellule grossit et prend une forme irrégulière. C'est alors que peut se produire le bourgeonnement ; dans le bourgeon on note quelques granules, souvent 4. Parfois toutes ces modifications apparaissent avant le stade à 8 granules ; de toute façon la cellule anormale est globuleuse et irrégulière (voir schéma 4 et n° 4 de la figure).

Chez *A. chroococcum* on voit la cellule s'allonger progressivement avec augmentation du nombre des granules qui se disposent linéairement, longitudinalement, sans régularité. La cellule ne se divise pas et finit par présenter l'aspect d'un long et gros filament bourré de grains chromatiques plus ou moins

éloignés les uns des autres. On peut parfois noter, après un certain temps, une série d'étranglements sur ce filament, donnant une image de chapelet irrégulier. Puis les segments se détachent, donnant des cellules d'aspect presque normal. Dans ce cas il



SCHÉMA 4. — *A. agilis*. Formes bourgeonnantes.

s'agit plutôt d'un retard de la division cellulaire (voir schéma 5 et nos 5 et 5 bis de la figure).

Il existe de nombreux points communs entre les cycles nucléaires que nous venons de décrire et ceux qui ont été trouvés par divers auteurs dans d'autres bactéries. En particulier, dans les cultures jeunes, le retard de la division cellulaire sur la divi-

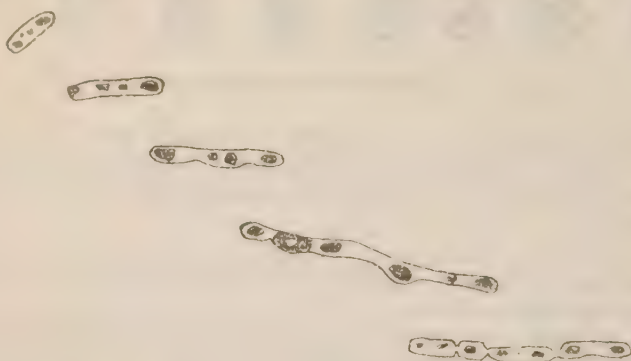
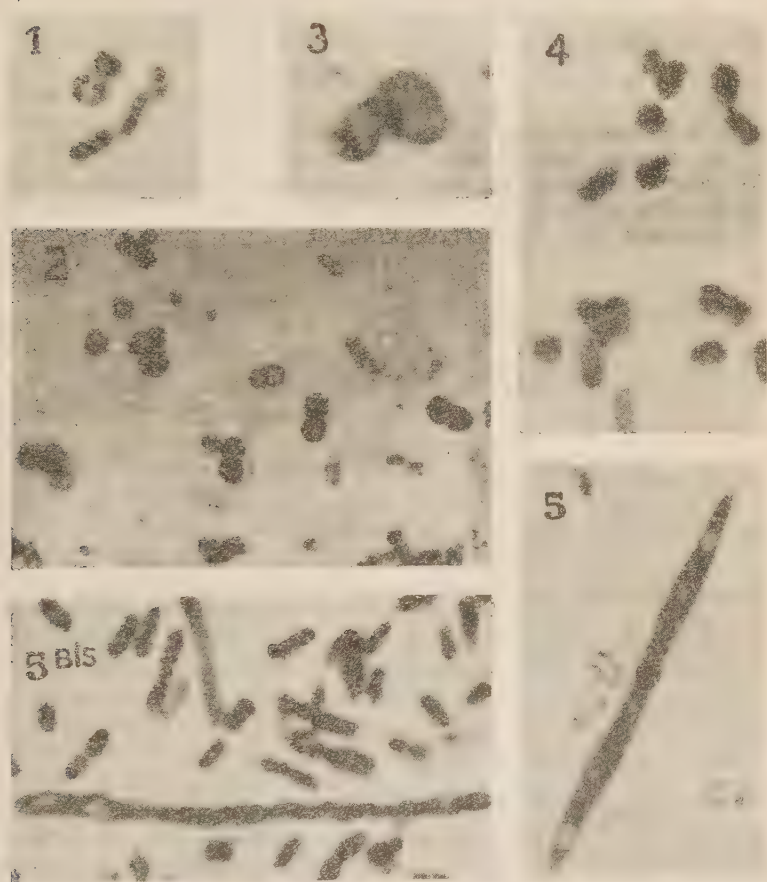


SCHÉMA 5. — *A. chroococcum*. Formes géantes.

sion nucléaire, avec cellules à 4 ou 8 granules, est un fait assez général. De même, dans les cultures plus âgées, l'irrégularité de la répartition des grains dans les cellules et la discordance des divisions cellulaires et nucléaires est un fait banal. Par contre, les phénomènes observés dans l'évolution anormale, aussi bien d'*A. agilis* que d'*A. chroococcum* nous semblent assez différents de ce qui a été décrit jusqu'ici et surtout le mode de germination des kystes est tout à fait dissemblable du mode de germination des spores de *B. mycoides*, par exemple.

Il nous a été donné de préciser, au cours de cette étude, les facteurs déterminant l'évolution morphologique anormale des

Azotobacter. Winogradsky avait vu le rôle des facteurs nutritifs. Si ceux-ci ont indubitablement un rôle, ils ne sont pas les seuls et toute modification physique des conditions de culture, qui vient perturber le métabolisme des germes retentit sur le cycle morphologique.



C'est ainsi que nous avons noté que si l'on élève la température au-dessus de 39° , pendant quelques jours, on voit apparaître des formes trois à six fois plus longues que les formes normales. En milieu au benzoate de soude (qui est un aliment dit « normal ») des germes géants apparaissent si la réaction est au-dessus de $\text{pH} = 7,7$. La carence en Mg ou en P entraîne l'apparition des formes anormales.

Ainsi, chaque fois qu'un facteur vient modifier l'équilibre métabolique normal, l'évolution morphocytologique est perturbée. Si le facteur perturbant n'agit pas trop longtemps, on voit d'ailleurs les germes reprendre leur forme normale lors des repiquages ultérieurs.

Les *Azotobacter* apparaissent donc, une fois de plus, [5] comme un matériel de choix pour les études de physiologie et de morphologie microbiennes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *J. Agr. Res.*, 1916, 6, 675.
- [2] *Ces Annales*, 1938, 60, 351.
- [3] *Ces Annales*, 1938, 60, 351.
- [4] In « *The bacterial cell* », Dubos, 1947.
- [5] DELAFORTE (B.), *Thèse Paris*, 1939, 60.

TOXINE DU *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* (*)

par MAYLIS GUILLAUMIE et A. KRÉGUER.

Les expérimentateurs qui ont comparé les toxines élaborées par les *Cl. chauvoei* (1) et *septicum* ont signalé que la dose minima mortelle de la toxine *chauvoei*, injectée dans les veines de la souris, provoque la mort d'une manière foudroyante, alors que l'injection intraveineuse de faibles doses de toxine vibron septique ne détermine la mort de la souris qu'en vingt-quatre à quarante-huit heures.

Quelques travaux mettent en doute les propriétés nécrosantes de la toxine *chauvoei*.

Nous avons examiné en 1945 des toxines *chauvoei* qui contenaient, d'après les titrages par voie veineuse sur souris, 40 ou 60 doses mortelles (D. M.) par centimètre cube, c'est-à-dire des toxines qui, à la dose de 1/40 ou 1/60 cm³ tuaient rapidement des souris de 17 à 20 g. Injectées dans le derme, aux doses de 0,1 à 0,2 cm³, de telles toxines font apparaître chez les cobayes blancs épilés, des taches nécrotiques de 4 à 5 mm. de diamètre. Après une heure de chauffage à 100°, ces toxines ne manifestent plus d'effet nécrosant. A la dose de 0,01 cm³, des toxines vibron septique renfermant 300 à 400 D. M. par centimètre cube (souris, veines) provoquent, en injection intradermique, chez le cobaye, des surfaces nécrosées de 8 x 11 mm. environ.

En injection intraveineuse, la toxine *chauvoei* est considérablement plus nocive pour la souris qu'en injection sous-cutanée. En effet, une toxine qui, en injection intraveineuse, tue en deux minutes à la dose de 0,025 cm³, doit être injectée à la dose de 1 cm³ par voie sous-cutanée pour déterminer la mort : celle-ci survient en deux à trois jours. Une de nos toxines *chauvoei* précipitées par le sulfate neutre d'ammonium tue instantanément les souris à la dose de 0,19 mg. lorsqu'elle est injectée par voie veineuse et elle ne les tue pas à la dose de 15 mg. lorsque l'injection est faite sous la peau ; à la dose sous-cutanée de 40 mg., elle tue seulement une souris sur 6 ; à la dose de 60 mg. elle en tue 3 sur 4 en deux et trois jours. En titrant sur souris deux préparations de toxine vibron septique précipitées par le sulfate d'ammonium, nous avons constaté que ces deux toxines étaient en moyenne douze fois moins nocives en injection sous-cutanée qu'en injection intraveineuse.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1948.

(1) Synon. : bacille du charbon symptomatique.

Pour faire contraste rappelons que la toxine *œdematians* est généralement deux à trois fois moins nocive en injection intra-veineuse qu'en injection sous-cutanée (2).

Les toxines *chauvœi* préparées en bouillon Vf glucosé à 1 ou 2 p. 1.000 sont acides : pH 5,2 à 6,5. Dix préparations, à des doses comprises entre 0,005 et 0,0004 cm³, ont rapidement hémolysé, à la température de 37°, les globules présents dans 0,1 cm³ d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies lavées de mouton, le titrage étant fait en présence d'eau physiologique ordinaire, pH 6,4-6,8 ; en présence d'eau physiologique tamponnée à 7,4 par des phosphates monopotassique et disodique, l'effet hémolytique a été moins intense. Exemple : la dose minima hémolytique (D. M. H.) d'une toxine est de 0,004 cm³ dans l'eau physiologique ordinaire et de 0,01 cm³ dans l'eau tamponnée à pH 7,4. En examinant 5 préparations de toxine vibron septique (pH 5,3 à 5,6), nous avons constaté que cette toxine également était moins hémolytique dans l'eau physiologique tamponnée à pH 7,4 que dans l'eau physiologique ordinaire. Exemple : D. M. H. d'une toxine : 0,02 cm³ en présence d'eau physiologique ; 0,4 cm³ dans l'eau tamponnée à pH 7,4.

La réaction de M. Bernard, conseillée par Goidsenhoven et Bertrand pour différencier par une épreuve hémolytique le *Cl. chauvœi* du *Cl. septicum*, ne nous a pas paru jusqu'ici un moyen sûr de diagnostic, même lorsque nous avons utilisé des cultures de vibron septique âgées de quarante-huit heures.

Alors que le cholestérol n'atténue que légèrement l'effet hémolytique de la toxine *chauvœi* nettement acide, il diminue de 50 à 90 p. 100 l'effet de la toxine ajustée à pH 6,9 avec de la soude. Le cholestérol affaiblit de 35 à 50 p. 100 l'activité hémolytique de la toxine vibron septique de pH 5,6 à 5,75 ; il supprime la faible action lytique de la toxine ajustée à pH 6,9.

INFLUENCE DE LA CHALEUR SUR LA TOXINE CHAUVOËI. — En étudiant les propriétés de la toxine *perfringens*, nous avons observé le phénomène paradoxal suivant : la toxine *perfringens* fraîchement préparée ne manifeste pas d'action léthale, hémolytique, nécrosante ni lécithinasique après 5 minutes de chauffage à 70° ; par contre, elle est nocive après 5 minutes à 100° : elle tue les souris, elle est hémotoxique et dermonécrosante (3).

(2) MAYLIS GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1942, 68, 202.

(3) M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FARRÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 273, 302 et 794. En appliquant la méthode des cultures de tissus, E. Lasfargues et A. Delaunay ont confirmé le fait que la propriété nécrosante de la toxine *perfringens* disparaît en cinq minutes à la température de 70° et reparait au cours d'un chauffage de cinq minutes à 100°. Ces *Annales*, 1946, 72, 38.

Après avoir réparti dans des tubes deux préparations de toxine *chauvoei* contenant, avant tout chauffage, 40 D. M. et 1.000 D. H. par centimètre cube, les tubes ont été placés pendant cinq minutes dans des bains-marie à 70° ou 100°. Après cinq minutes à 70°, les deux toxines n'avaient plus de propriétés hémolytiques ; par contre elles étaient nettement hémotoxiques après cinq minutes à 100° : elles titraient alors 125 et 160 D. H. par centimètre cube. Les deux toxines ayant perdu leur effet hémolytique à 70° ont été portées ensuite pendant cinq minutes à 100° ; elles sont redevenues nettement hémolytiques. Après cinq minutes à 70° les deux toxines envisagées n'ont pas tué la souris à la dose de 0,5 cm³ (veines). Après cinq minutes à 100°, elles étaient nocives *in vivo* : l'une d'elles contenait 5 à 10 D. M. par centimètre cube ; elles l'étaient aussi après deux chauffages successifs de cinq minutes chacun : le premier à 70° et le deuxième à 100°. La substance responsable de l'action léthale de la toxine du *Cl. chauvoei* est donc thermorégénérée à 100°. Signalons en outre que la toxine *chauvoei* est dermonécrosante après cinq minutes de chauffage à 100°. Indiquons aussi que cette toxine, avant et après un tel chauffage, opacifie le sérum humain, ce qui donne à penser qu'elle contient une lécithinase.

Quatre autres préparations renfermant 20 à 100 D. M. et 500 à 2.500 D. H. par centimètre cube ont été chauffées à différentes températures. Après cinq minutes à 70° l'une d'elles n'était plus hémolytique, les trois autres contenaient 12 à 100 D. H. par centimètre cube. Après une heure à 100°, ces 4 toxines titraient 25 à 100 D. H. par centimètre cube ; elles ne tuaient pas les souris à la dose de 0,5 cm³ (injection intraveineuse).

ACTION DU FORMOL SUR LA TOXINE *chauvoei*. — La toxine *perfringens* formolée de 1 à 3 p. 1.000 est détournée en quarante-huit heures à 37° dans les expériences de Weinberg et Prévot (1924). D'après Penfold et Tholhurst (1937), la détournement en présence de 3,5 p. 1.000 de formol se produit en sept à quatorze jours. Nous avons signalé que certaines toxines formolées à 5 p. 1.000 perdaient leur nocivité pour la souris en quarante-huit heures à 37°, alors que d'autres n'étaient plus nocives *in vivo* qu'après cinq à huit jours d'étuve ; au bout de douze jours à 37°, elles possédaient encore un léger effet hémolytique *in vitro* ; en présence de 1 p. 1.000 seulement de formol nos préparations de toxine *perfringens* étaient encore toxiques après quarante-cinq jours à 37° (4).

Tandis que différentes préparations de toxine *chauvoei* formolées à 2 p. 1.000 ne sont plus nocives pour la souris après cinq jours d'étuve à 37°, d'autres, au contraire, contiennent encore 5 à 10 D. M. par centimètre cube après sept jours à 37° ; ces der-

nières perdent ensuite en dix à quatorze jours à 20° leur action léthale pour la souris mais restent encore hémolytiques *in vitro*. La toxine *chauvæi* formolée à 4 p. 1.000 n'est plus nocive *in vivo* après trois à cinq jours à 37° ; elle est encore très hémolytique après cette durée d'étuve.

INFLUENCE DES SÉRUMS SUR LA TOXINE *chauvæi*. — D'après Kerrin (1934), Weinberg et Davesne (1935), de nombreux sérums normaux neutralisent la toxine *chauvæi* ; les titrages de Kerrin indiquent qu'un sérum de lapin à la dose minime de 0,0025 cm³ a pu neutraliser 10 D. M. de toxine. Mason (1936), en recherchant aussi l'action des différents sérums normaux sur la toxine *chauvæi*, n'a pas observé d'effet neutralisant avec le sérum de 4 chevaux, 10 moutons, 10 cobayes, 4 chèvres ; cet auteur a cependant noté que le sérum d'un bœuf et de plusieurs lapins manifestait un léger pouvoir antitoxique.

Les sérums anti-vibron septique, d'après Weinberg et Davesne (1935), renferment des antitoxines anti-*chauvæi*. Les sérums anti-*perfringens* (A, B, D), anti-œdématis, anti-histolytique ne neutralisent pas la toxine *chauvæi* ; celle-ci est très efficacement inhibée par l'antitoxine homologue ainsi que par le sérum des moutons ayant reçu des injections d'anaculture vibron septique (Mason, 1936). Davoli (1940) considère aussi que l'antitoxine vibron septique neutralise la toxine *chauvæi* ; Uenaka avait émis l'opinion contraire en 1938.

Nous avons titré d'abord 10 sérums normaux (provenant de 4 chevaux, 1 veau, 1 bœuf, 1 lapin, 2 chiens, 1 homme) et 10 immunsérums de chevaux (4 anti-vibron septique, 2 anti-histolytiques, 4 anti-*perfringens*). Dans ces recherches préliminaires nous avons déterminé le plus petit volume de sérum qui supprimait l'action léthale de 2 D. M. de toxine *chauvæi*. Chaque mélange de toxine et de sérum a été injecté par voie veineuse à des souris quarante-cinq minutes après sa préparation. Nous avons utilisé soit 2 toxines précipitées par le sulfate d'ammonium préparées avec 2 souches bovines de *Cl. chauvæi*, soit de la toxine *chauvæi* liquide, fraîchement obtenue. D'après nos résultats, de très petits volumes de sérum normal neutralisent la toxine *chauvæi*. Il a suffi, en effet, de 0,005 cm³ d'un sérum normal de cheval pour neutraliser la dose d'épreuve de toxine ; d'autres ont même été efficaces aux doses de 1/800 cm³, 1/1.200 et 1/2.800 cm³. Les sérums de veau, de bœuf, de lapin, de chien et d'homme ont été actifs respectivement aux doses de 1/600, 1/2.000, 1/600, 1/1.000, 1/20.000 de cm³. Quant aux immunsérums examinés, ils n'ont pas manifesté une activité anti-*chauvæi* supérieure à celle des sérums normaux.

Par la suite, nous avons examiné les titres anti-*chauvæi* et anti-vibron septique du sérum prélevé à 4 chevaux avant toute immunisation et après des injections répétées de toxine vibron septique. Au cours de cette investigation, le titre anti-*chauvæi* a été déter-

miné sur souris (veines) vis-à-vis de 5 D. M. de toxine *chauvoei* et le titre anti-vibrion septique par le procédé international. Avant l'immunisation, l'activité anti-*chauvoei* des sérums était très élevée, tandis que le pouvoir anti-vibrion septique était inappréciable d'après les épreuves sur souris. Les titrages après immunisation ont montré que vis-à-vis de la toxine *chauvoei* la valeur antitoxique des sérums de chevaux en expérience ne subissait pas de variations significatives sous l'influence des inoculations mentionnées, alors que vis-à-vis de la toxine vibrion septique le titre antitoxique des sérums dépassait 100 unités internationales (souris, veines). Il semble donc que l'antitoxine vibrion septique soit sans action sur la toxine *chauvoei*.

Le sérum humain précédemment cité, remarquable par sa très grande activité neutralisante vis-à-vis de la toxine *chauvoei* a été incapable, même à la dose de 0,5 cm³, de neutraliser 2 D. M. de toxine vibrion septique ; les constituants sériques normaux qui inhibent la toxine *chauvoei* sont donc manifestement sans action sur l'exotoxine du *Cl. septicum*.

Le sérum humain mentionné, ainsi que les sérums normaux de cheval que nous avons examinés, n'ont pas exercé le moindre pouvoir préventif à l'égard de la toxine *chauvoei* dans les conditions suivantes : injection sous-cutanée de 0,5 cm³ de sérum à plusieurs souris ; trente minutes plus tard, injection intraveineuse de 2 D. M. de toxine *chauvoei* aux mêmes animaux ; toutes les souris meurent. Mais, fait intéressant, si les sérums sont injectés dans les veines, à la dose de 0,4 cm³, ils protègent parfois quelques souris contre 2 D. M. de toxine *chauvoei* introduites dans les veines trente minutes après le sérum.

A la dose de 0,005 cm³ et même de 0,002 cm³, quelques sérums normaux anti-*perfringens* ou anti-œdématiens inhibent *in vitro* 20 D. H. de toxine vibrion septique ; par contre, il faut employer de tels sérums aux doses de 0,2 à 0,5 cm³ pour neutraliser *in vitro* 20 D. H. de toxine *chauvoei* (sérums de chevaux). L'anti-hémolysine 6 ne supprime pas l'effet hémolytique de la toxine *chauvoei* en présence d'eau physiologique ordinaire. En général, à la dose de 0,005 cm³, les sérums anti-*chauvoei* neutralisent 20 D.H. de toxine *chauvoei*.

SÉRUMS DÉLIPIDÉS. — Après avoir constaté que le cholestérol était capable de diminuer nettement la nocivité de la toxine *chauvoei* pour la souris, nous nous sommes demandé si les lipides sériques exerçaient une action sur cette toxine : nous avons recherché si les sérums délipidés étaient moins antitoxiques vis-à-vis de la toxine *chauvoei* que les sérums non délipidés. Nous avons examiné, avant et après délipidation par le procédé de Hardy et Gardiner, un sérum normal, un sérum anti-*perfringens*

et 2 sérums antigangréneux polyvalents (sérums de chevaux). Dans ces expériences, 5 D. M. de toxine *chauvœi* ont été additionnées de quantités variables du sérum à titrer et les mélanges ont été injectés quarante-cinq minutes plus tard par voie veineuse à des souris de 17 à 20 g. Alors que les 4 sérums avant délipidation neutralisaient 5 D. M. de toxine *chauvœi* à la dose de 0,0025 cm³, le sérum normal délipidé n'a manifesté un pouvoir neutralisant qu'à la dose de 0,1 cm³ ; employé à la dose de 0,05 cm³, il n'a permis la survie d'aucune souris. Les trois immunsérums délipidés, employés à la dose de 0,2 cm³, n'ont pas neutralisé 5 D. M. de toxine.

Au moment de la réalisation de ces titrages, le sérum anti-*perfringens* délipidé titrait, par centimètre cube, 120 unités anti-*a* et 400 unités anti-*o*. Un des sérums antigangréneux délipidés titrait 150 unités anti-vibron septique, 150 unités anti-*œdematiens*, 20 unités anti-histolytiques, 40 unités anti-*perfringens a* et 600 unités anti-*perfringens o* ; ainsi donc, ce sérum délipidé, très antitoxique vis-à-vis de plusieurs toxines et en particulier vis-à-vis de la toxine vibron septique, s'avère inefficace à l'égard de la toxine *chauvœi*. Ce fait parle en faveur de l'opinion que nous avons énoncée, à savoir que l'antitoxine vibron septique ne neutralise pas la toxine *chauvœi*.

ADRÉNALINE ET TOXINE CHAUVOËI. — La toxine *chauvœi* a un effet hypotenseur. A un chien de 10 kg. ont été administrées, par voie veineuse, des doses variables d'une toxine *chauvœi* contenant 40 D. M. par centimètre cube d'après les titrages sur souris ; une faible quantité de toxine — 0,1 cm³ par kilogramme — détermine une hypotension légère et de courte durée, mais les doses cinq et dix fois plus grandes déclenchent une hypotension extrêmement forte ; après injection de 2 cm³ de toxine par kilogramme, l'hypotension a été de longue durée et la mort est survenue.

Nous avons recherché si une substance hypertensive serait capable d'augmenter la résistance des souris à la toxine *chauvœi*. Nous avons utilisé l'adrénaline (5). Nous avons injecté à des souris, 0,05 mg. d'adrénaline Sitza sous la peau, puis 2 D. M. de toxine *chauvœi* dans les veines ; la toxine a été injectée soit immédiatement après l'adrénaline, soit une heure et demie ou cinq heures plus tard. Toutes les souris sont mortes peu après l'injection de la toxine. Dans un autre essai, nous avons injecté 2 D. M. de toxine *chauvœi* dans les veines et, immédiatement après, 0,025 mg. d'adrénaline sous la peau. Les souris sont mortes.

L'adrénaline ne semble pas atténuer la toxine *chauvœi*. En effet, le mélange de 0,03 mg. d'adrénaline Carrion et de 2 D. M. de

(5) D'après A. G. MARIE, l'adrénaline neutralise des quantités importantes de toxine tétanique.

toxine *chauvœi* tue les souris, qu'il soit injecté dans les veines aussitôt après sa préparation ou après dix-huit heures de séjour dans une étuve à 37°. De même, le mélange de 0,07 mg. d'adrénaline et de 3 D. M. de toxine *chauvœi*, après vingt heures de contact à 39°, est encore toxique pour les souris : elles meurent en deux à cinq minutes.

Nous avons vérifié que les doses d'adrénaline utilisées dans ces essais n'étaient pas toxiques pour la souris.

SUBSTANCES ANTI-HISTAMINIQUES ET TOXINE CHAUVOEI. — Le choc que déterminent les injections intraveineuses de toxine *chauvœi* fait penser au choc que produit l'histamine ; aussi avons-nous recherché si des anti-histaminiques puissants protégeraient les cobayes contre une injection intraveineuse de toxine *chauvœi*. Comme anti-histaminiques nous avons essayé le néo-antergan (N-diméthyl amino-éthyl-N- p.méthoxyaminopyridine) et le 3277 R. P. (N-diméthyl-amino-2-propyl-1-thiodiphénylamine). Nous les avons administrés aux cobayes sous la peau, à la dose de 10 et 20 mg. par kilogramme ; vingt minutes plus tard la toxine *chauvœi* a été injectée par voie veineuse. Ni le néo-antergan (2686 R. P.), ni le 3277 R. P. n'ont protégé les cobayes contre 2 D. M. de toxine *chauvœi*.

CONCLUSIONS. — L'effet hémolytique de la toxine *chauvœi* est plus intense en présence d'eau physiologique ordinaire qu'en présence d'eau physiologique tamponnée à pH 7,4 par des phosphates.

Après cinq minutes de chauffage à 70°, certaines préparations de toxine *chauvœi* ne sont plus toxiques *in vivo* ni hémolytiques *in vitro*. Après cinq minutes de chauffage à 100°, la toxine *chauvœi* est toxique pour la souris et hémolytique ; après une heure à 100°, elle n'est plus létale ni dermonécrosante.

L'effet hémolytique de la toxine *chauvœi* additionnée de formol est encore très prononcé lorsque l'action létale de cette toxine a déjà disparu.

L'adrénaline, dans les conditions expérimentales essayées, n'exerce pas d'effet antitoxique vis-à-vis de la toxine *chauvœi*.

Deux anti-histaminiques puissants, le 2686 R. P. et le 3277 R. P., ne protègent pas le cobaye contre la toxine *chauvœi*.

Beaucoup de sérums normaux possèdent à un haut degré le pouvoir de supprimer l'action létale de la toxine *chauvœi*. Après délipidation, divers sérums ne neutralisent plus cette toxine.

ACTION DES SAVONS A CATION ACTIF SUR LES PROTÉINES

I. — PRÉCIPITATION DE LA SÉRUMALBUMINE PAR UN CATION GRAS

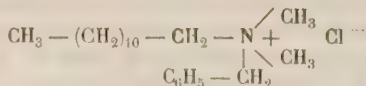
par J. POLONOVSKI et M. MACHEBOEUF (*).

Les savons à cation actif, qui sont des amines quaternaires, sont des antiseptiques puissants dont l'action bactériostatique et bactériolytique commence à faire l'objet de nombreuses recherches. Nous avons précédemment rapproché leur action lysante sur le pneumocoque de celle des antibiotiques polypeptidiques également cationiques (tyrocidine) [1]. Nous nous sommes proposé d'éclaircir leur mode d'action par une étude systématique de leur action sur les éléments de la matière vivante (lipides [2], protéines, cénapses, systèmes diastasiques).

L'action précipitante des savons à cation actif sur les protéines, signalée pour la première fois par Kuhn et Bielig en 1940 [3] n'a fait l'objet que d'un nombre restreint de travaux. Citons les publications de E. Pfankuch et G. A. Kausche [4], de Jaffe [5] et de K. H. Schmidt [6].

Ce phénomène nous paraît des plus intéressants tant par son aspect théorique que par son utilisation pratique. Sa connaissance nous éclairera certainement aussi sur les actions biologiques des amines.

Une des protéines les mieux étudiées et les plus faciles à obtenir cristallisées est sans doute la sérumalbumine de cheval. Le savon à cation actif dont nous nous sommes servis pour les expériences suivantes est le zéphirol (chlorure de laurylbenzyltriméthyl ammonium) :



I. — PRÉCIPITATION DE LA CRISTALBUMINE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE ZÉPHIROL.

Cette première série de recherches a été faite avec une sérumalbumine de cheval cristallisée trois fois dans le sulfate d'ammo-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1948.

nium et dialysée contre de l'eau bidistillée (albumine isoélectrique). Nous avons amené les solutions d'albumine à un pH déterminé par la quantité de soude N/10 juste suffisante, en évitant l'addition de sels ou de tampons capables d'interférer dans l'action des ions précipitants.

La solution d'albumine étant donc à un pH déterminé, on étudie sa précipitation par des quantités croissantes de zéphirol, le volume total de la solution étant maintenu constant par l'addition d'eau distillée.

1° Au-dessous d'un pH voisin de 7-7,5, on n'observe qu'un trouble de la solution, qui ne précipite pas, quelle que soit la quantité de zéphirol. Ce pH limite dépend de la préparation d'albumine utilisée : nous avons obtenu une préparation d'albumine particulièrement purifiée qui présentait déjà une précipitation à partir de pH 5,2.

2° A pH 8-9 la précipitation commence brusquement pour une quantité de zéphirol déterminée, puis elle passe par un maximum et diminue ensuite rapidement quand on ajoute du zéphirol. Pour les plus grandes quantités de zéphirol le précipité ne se forme plus ou se redissout dans l'excès de zéphirol.

3° A pH supérieur à 10 ou 11, il en est de même jusqu'à un maximum de précipitation, mais ensuite la solubilisation dans l'excès de zéphirol ne se fait que très difficilement et pour une quantité de zéphirol bien plus considérable : plus le pH est élevé, moins il devient possible de se trouver dans la zone de solubilité par excès de zéphirol.

Il y a donc une zone de précipitabilité de la protéine en fonction de la concentration de zéphirol. Cette zone dépend du pH : elle commence aux environs de pH 7, puis elle augmente avec le pH. D'autre part, la quantité de zéphirol minimum pour précipiter l'albumine augmente peu à peu avec le pH (cf. fig. 1 : poids du précipité lavé à l'eau distillée et séché en ordonnées et poids du zéphirol en abscisses).

La précipitation de l'albumine ne dépend pas simplement de la concentration du milieu en albumine ni en zéphirol, mais du rapport entre les quantités de zéphirol et d'albumine présentes. Il ne s'agit pas d'un relargage par action de sels mais d'une relation stoechiométrique entre la protéine et le cation. Nous verrons plus loin que la quantité de zéphirol limite (valeur critique) à partir de laquelle se forme le composé insoluble dépend de la quantité de cations minéraux (ions Na^+) présents dans le milieu. La quantité de zéphirol correspondant à la précipitation optimale est d'environ 16 p. 100 de protéine (près de 15 p. 100 exprimés en cation, soit un cation zéphirol pour 15 acides aminés environ).

Le précipité est soluble dans un excès de zéphirol, du moins tant que le pH n'est pas trop élevé.

II. — PRÉCIPITATION EN FONCTION DU pH.

On peut faire l'étude de la précipitation en fonction du pH à quantité de zéphirol constante.

1° Pour une concentration faible en zéphirol (inférieure à la valeur critique précédemment définie), on n'observe aucune précipitation quel que soit le pH.

2° A partir de cette valeur critique de la teneur en zéphirol, la précipitation se produit dans une zone déterminée de pH entre

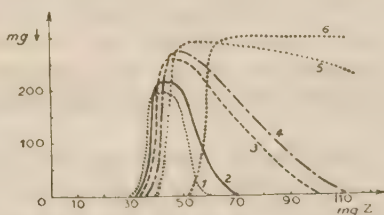


FIG. 1. — (240 mg. alb.) 6 courbes n° 1 à 6 pour 6 pH : 8,0-8,2-8,7-9,2-10,5-12.

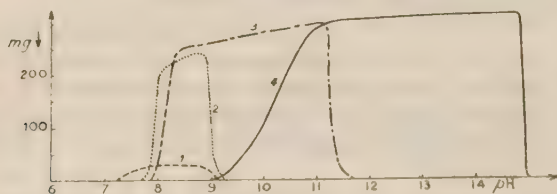


FIG. 2. — 4 quantités différentes de zéphirol : 30 mg.-40 mg.-50 mg.-120 mg.

deux valeurs critiques du pH. A l'intérieur de cette zone, la précipitation augmente avec le pH.

3° Pour une forte teneur en zéphirol, la précipitation a lieu au-dessus d'une valeur critique du pH mais la zone devient illimitée du côté des pH alcalins. Cette seconde valeur particulière du rapport zéphirol/protéine est approximativement triple de la précédente mais ne correspond sans doute à aucune combinaison définie, car l'absence de redissolution est due à l'impossibilité d'augmenter encore le pH. (Cette valeur est voisine de 40 mg./100 mg.).

Il y a donc une zone de précipitabilité en fonction du pH (fig. 2). Cette zone se déplace en fonction de la concentration en zéphirol. Il existe cependant une valeur de pH minimum au-dessous de laquelle la sérumalbumine n'est pas précipitable, quelle que soit la concentration en zéphirol (entre pH 7,5 et 5,2 suivant l'échantillon et son degré de pureté). Il existe aussi une quantité minimale de zéphirol au-dessous de laquelle la précipitation ne se fait pas, quel que soit le pH.

III. — INFLUENCE DES IONS MINÉRAUX.

Nous avons évité jusqu'ici d'introduire dans le milieu des ions minéraux autres que la petite quantité de Na^+ contenue dans la soude N/10 et Cl^- apportée par le zéphirol. Mais si nous ajoutons des sels alcalins (tampons boratés, phosphatés, carbonatés, chlorure de sodium, sulfate de sodium) en quantité variable, les courbes de précipitation se trouvent modifiées. En toute rigueur il convient donc de tenir compte de la petite teneur en ions du milieu précédent.

Quel que soit le sel de sodium utilisé, les modifications sont toujours à peu près identiques.

1° La plus petite quantité de zéphirol nécessaire pour précipiter l'albumine augmente avec la quantité de sel ajoutée. Cette augmentation rappelle celle que nous observons par l'addition de soude simplement. Elle paraîtrait donc liée à la quantité d'ions Na^+ présente dans le milieu. Elle ne dépasse guère la valeur déjà notée de 40 mg. de zéphirol pour 100 d'albumine (elle est environ 20 mg. p. 100 pour 0,50 ion mg. de Na p. 100 mg. d'albumine).

2° La pente de la partie ascendante de la courbe de précipitation par rapport à la teneur en zéphirol diminue avec la quantité de sel ajoutée ; le maximum de précipitation se trouve donc déplacé assez largement vers les grandes teneurs en zéphirol.

3° Il en est de même de la pente de la partie descendante pour les fortes concentrations salines. En présence de sels, le précipité est relativement moins soluble dans l'excès de zéphirol (fig. 3).

Les sels minéraux ont donc une influence nette sur la précipitation dans cette zone de pH supérieure au pH critique. Mais au-dessous de ce pH critique, ils provoquent également la précipitation du complexe protéine-zéphirol au voisinage de pH 4-5, c'est-à-dire du point iso-électrique de l'albumine. Il s'agit alors d'un relargage par action de sels : en effet, c'est la concentration absolue en chlorure de sodium qui intervient et non le rapport $\text{Na}^+/\text{protéine}$; alors que dans le cas précédent le rapport limite de précipitation zéphirol/protéine augmentait avec la quantité de chlorure de sodium ajoutée, c'est l'inverse qui a lieu à pH 4-5 : 6 p. 100 de chlorure de sodium sont nécessaires pour relarguer l'albumine seule. Pour un rapport zéphirol / protéine = 30 mg./40 mg., il suffit de 3 p. 100 de chlorure de sodium. Ces résultats rappellent ceux qu'on obtient dans la précipitation des protéines par les sels de métaux lourds comme le mercure [7].

Il est encore intéressant de signaler l'action des sels de métaux autres que le sodium (alcalinoterreux, cuivre, etc.) sur la précipitation de l'albumine par le zéphirol : 1° Ils ont une influence analogue à celle des sels de sodium sur les quantités minimale et

optimale de zéphirol à ajouter pour précipiter la protéine ; 2° On observe un déplacement du pH minimum de précipitation vers les pH élevés. De plus, la présence de zéphirol empêche la précipitation du complexe protéine-métal pour les pH inférieurs à ce pH limite.

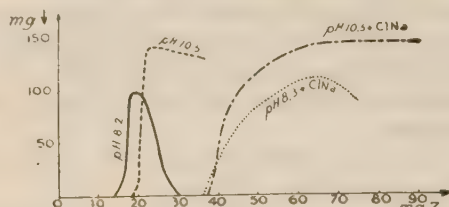


FIG. 3. — Influence de 90 mg. de ClNa pour 110 mg. de d'albumine.

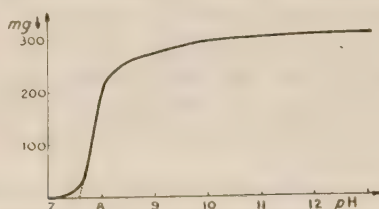


FIG. 4. — Maximum de précipitation en fonction du pH.

IV. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

L'étude qualitative de la précipitabilité des protéines (caséine, ovalbumine, sérumglobuline, etc.) par les savons à cation actif fait aussitôt songer à la neutralisation des charges négatives de la protéine par le cation et ainsi à la précipitation d'un sel. Pour ces protéines, en effet, la précipitation paraît à très peu près s'effectuer dans la zone de pH supérieure au point isoélectrique. Jaffe a même préconisé l'emploi de ces réactifs pour une détermination simple du point isoélectrique. Cette hypothèse séduisante se trouve contredite dans le cas de la sérumalbumine. Est-ce une exception ? Cependant l'existence de ce point de pH limite peut servir à caractériser une protéine. Mais il faut alors faire attention aux faits suivants :

1° Que ce point ne peut être recherché à teneur constante en zéphirol, puisque le rapport critique zéphirol/protéine est *a priori* inconnu ;

2° Que les sels présents dans le milieu influencent d'une part ce rapport critique zéphirol/protéine, d'autre part le pH limite lui-même.

On peut déterminer ce point, qui n'est pas le point isoélectrique, en traçant la courbe du maximum de précipitation en fonction du pH.

Dans le cas de la sérumalbumine cristallisée trois fois, nous avons la courbe suivante (fig. 4).

Cette courbe est d'ailleurs l'enveloppe des courbes de la figure 2.

Il subsiste une indétermination pour le point de rencontre de la courbe avec l'axe des pH. Dans le cas de la figure 4, nous trouvons un pH critique voisin de 7,7. Il ne s'agit donc nullement du point isoélectrique. En outre, ce point dépend de la préparation d'albumine utilisée. Avec une sérumalbumine de cheval dialysée douze jours à partir d'un pH acide (pH 4) afin d'éliminer le mieux possible les cations minéraux, nous avons obtenu un pH critique voisin de 5,3 et en même temps une valeur critique du rapport zéphirol/protéine très inférieure aux précédentes et voisine de 3 mg. de zéphirol pour 100 d'albumine. En ajoutant à cette préparation des traces d'ions calcium (de l'ordre de 0,01 à 0,1 ion mg. pour 100 mg. d'albumine) nous avons trouvé une élévation du pH critique vers pH 7 à 8 et une élévation très nette de la valeur critique du rapport zéphirol/protéine. En conclusion :

1° L'absence de précipitation pour les doses de zéphirol inférieures à la valeur critique du rapport zéphirol/protéine, semble due à la teneur de l'albumine en cations concurrents (Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , etc.) ;

2° La valeur du pH critique de précipitation de l'albumine dépend également de cette teneur en cations et tend vers le pH isoélectrique quand on élimine les ions minéraux.

Quel est donc le mécanisme de cette précipitation ?

Le précipité formé est très visqueux : il s'enroule sur l'agitateur à la manière des associations nucléoprotidiques. Il colle aux parois du verre. Il est plus ou moins hydraté, selon le pH : à pH voisin de 8, il se rassemble même en une phase liquide translucide jaune plus dense que la phase aqueuse : il s'agit d'un coacervat comme ceux qui ont été déjà vus par M^{lle} Magnant et Dervichian [8].

Nous avons montré qu'il ne s'agit pas d'un relargage par le zéphirol, mais d'un complexe stoechiométrique précipitant à partir d'un certain rapport zéphirol/protéine et au-dessus d'un certain pH critique et se redissolvant dans un excès de zéphirol.

D'après les travaux de l'école américaine sur les complexes protéines-savons à anion actif [9, 10], le savon se fixerait sur les groupes polaires de la protéine et les groupes apolaires étant ainsi orientés vers l'extérieur, le complexe deviendrait insoluble. Les rapports optimum de précipitation savon/protéine seraient en relation avec le nombre de groupes basiques libres de la protéine. La solubilisation dans un excès de savon donne lieu à des interprétations diverses : pour les uns [10], une seconde couche de savon inversement orientée et attirée par des forces de Van der

Waals recouvrerait le complexe d'une couche polaire. Pour les autres [9], l'excès de savon ferait apparaître de nouveaux groupes polaires de la molécule protéinique.

Il est très vraisemblable que le cas des savons cationiques est analogue : le zéphirol se fixerait par ses groupes polaires sur les pôles acides de la protéine. Cette hypothèse est d'autant plus probable que le zéphirol se comporte, dans ces conditions, à peu près comme les cations lourds minéraux (mercure).

Quant à la solubilisation dans l'excès de zéphirol, nous la croyons être la résultante de deux processus concomitants :

1° Une dissociation des particules protéiniques en fractions plus petites. Cette dissociation ferait apparaître de nouvelles faces protéiniques capables de fixer de nouvelles molécules de zéphirol.

2° Une orientation inverse des chaînes de zéphirol, le groupe polaire hydrophile étant alors tourné vers la phase aqueuse, et la chaîne apolaire attirée par ces faces hydrophiles de la molécule protéinique.

Enfin, la solubilisation du complexe en milieu fortement alcalin peut s'expliquer par l'apparition de nouvelles fonctions acides (énolisation des liaisons peptidiques), mais elle est sans doute en relation avec la présence des ions Na^+ , comme semble l'indiquer l'action analogue des sels de sodium. Les cations minéraux rendraient la molécule protéinique plus hydrophile : une plus grande quantité de zéphirol serait nécessaire pour rendre la protéine insoluble.

Notons que la combinaison de 110 mg. d'albumine avec 16 ou 17 mg. de zéphirol, combinaison insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions salines (fig. 3), réalise un modèle d'euglobulines. De même la combinaison de 110 mg. d'albumine avec 30 à 35 mg. de zéphirol, insoluble pour des concentrations salines moyennes mais soluble dans les solutions salines concentrées et dans l'eau pure, rappelle le comportement des nucléoprotéides.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POLONOVSKI (J.) et COTONI (L.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1155.
- [2] POLONOVSKI (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 19.
- [3] KUHN (R.) et BIELIG (H. J.). *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73**, 1080.
- [4] FRANKUCH (E.) et KAUSCHE (G. A.). *Biochem. Zeitschr.*, 1942, **312**, 72.
- [5] JAFFE (W. G.). *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 185.
- [6] SCHMIDT (K. H.). *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1943, **277**, 117.
- [7] HAARMANN (W.) et FRUBAUF-HEILMANN (E.). *Biochem. Zeitschr.*, 1941, **309**, 13 ; 1943, **314**, 1.
- [8] DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 655.
- [9] PUTNAM (F.) et NEURATH (H.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1902.
- [10] PANKHURST (K. G. A.) et SMITH (R. C. M.). *Trans. Faraday Soc.*, 1944, **40**, 565.

ACTION DES SAVONS A CATION ACTIF SUR LES PROTÉINES

II. — PRÉCIPITATION DES PROTÉINES DU SÉRUM PAR UN CATION GRAS

par J. POLONOVSKI et M. MACHEBOEUF.

A côté de la sérumalbumine purifiée, dont nous avons étudié le comportement, le sérum de cheval fournit par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, des globulines, précipitées par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à demi-saturation, dites globulines totales ; de celles-ci on peut encore isoler, par une précipitation à 34 p. 100 de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, des γ -globulines qui représentent une fraction grossièrement homogène à l'électrophorèse alors que les autres globulines (α et β) sont difficiles à obtenir isolées.

Nous avons donc étudié la précipitation du sérum total de cheval par le zéphirol, suivant les trois points de vue précédents : concentration en zéphirol, pH et influence des sels. Nous avons enfin complété cette étude par celle des γ -globulines. Ceci nous a permis de constater : 1° que le sérum se comporte comme la somme de ses constituants et 2° que les γ -globulines ne sont pas homogènes.

I. — PRÉCIPITATION DU SÉRUM TOTAL.

Le sérum de cheval est amené au pH désiré par de la soude N/10 ou de l'acide chlorhydrique N/10. Chaque essai est fait à partir de 1 cm³ de sérum et le volume total toujours ajusté à 8 cm³ par de l'eau distillée. En fonction de la concentration en zéphirol (fig. 1), la précipitation présente les caractéristiques suivantes :

1° A pH < 4 le sérum ne précipite pas, quelle que soit la teneur en zéphirol.

2° A pH 5 la précipitation est faible et n'a lieu que de 0 à 20 mg. de zéphirol. A pH 6 elle croît de 0 à 10 mg. de zéphirol, reste à peu près constante jusqu'à 20 mg. et décroît ensuite pour retomber à 0 vers 50 mg. de zéphirol. A pH 7-8 la courbe est sensiblement la même. La moitié des protéines du sérum environ est ainsi précipitable à ce pH et le précipité est soluble dans un excès de zéphirol. Entre pH 5 et 7, en l'absence de zéphirol, on observe un très léger précipité d'euglobulines (≤ 5 mg.).

3° Au-dessus de pH 8, le précipité ne se forme plus pour les

très petites quantités de zéphirol : la courbe se déplace peu à peu vers les fortes teneurs en zéphirol. Le maximum de précipitation s'élève jusqu'à précipitation totale des protéines du sérum (à partir de pH 10-11). La dissolution dans un excès de zéphirol est de plus en plus difficile et ne se fait plus lorsque le pH dépasse 10,5.

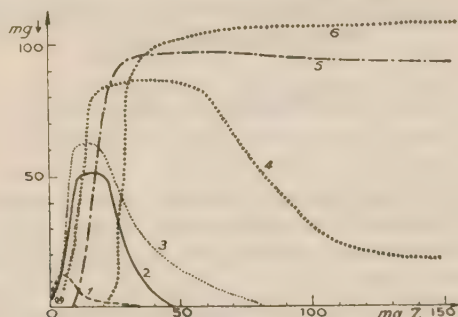


FIG. 1. — 6 courbes n° 4 à 6 pour 6 pH : 5-6-8-9,6-10,6-11.

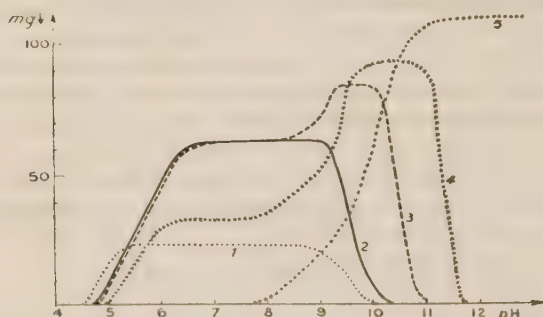


FIG. 2. — 5 quantités différentes de zéphirol : 5 mg.-10 mg.-30 mg.-100 mg.-400 mg.

La figure 2 résume l'étude de la précipitation en fonction du pH :

1° Jusqu'à 10 mg. de zéphirol, la précipitation commence dès pH 4,5 et atteint un palier plus ou moins rapidement, puis enfin diminue jusqu'à s'annuler vers pH 10 ;

2° A partir de 20 mg. la précipitation aux pH inférieurs à 8 diminue en même temps qu'apparaît une deuxième zone de précipitation débutant vers pH 8,5 ;

3° Pour les très fortes teneurs en zéphirol, la précipitation ne commence qu'à un pH de plus en plus élevé.

Ici encore, comme dans le cas de l'albumine cristallisée, la précipitation ne dépend pas simplement des concentrations de protéines ou de zéphirol mais seulement du rapport zéphirol protéine (complexes stoechiométriques).

Si on compare ces résultats avec ceux qu'on obtient avec la cristalbumine, on remarque que la précipitation commence dès pH 4,5, qu'elle s'effectue selon deux courbes nettement différentes. Ces deux courbes correspondent-elles à la distinction albumine et globuline ? Le palier est nettement marqué dans la figure 3 qui représente la courbe du maximum de précipitation en fonction du pH (enveloppe des courbes 2). Schmidt [1] obtient des résultats analogues. Il affirme que la première partie de la courbe (de pH 4,5 à pH 8) représente la précipitation des globulines seules. Il observe même la présence de paliers secondaires

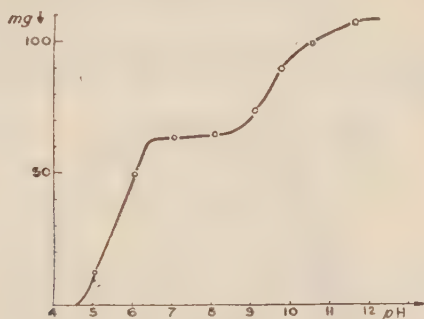


FIG. 3. — Maximum de précipitation eu fonction du pH.

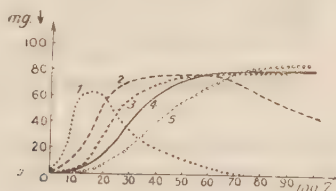


FIG. 4. — 5 quantités différentes de ClNa : 0-45 mg.-90 mg.-180 mg.-900 mg.

qu'il attribue à chacune des trois fractions de globulines α , β et γ . Nous n'avons pas pu reproduire fidèlement ces paliers à cause de l'imprécision même des mesures, surtout de la mesure du pH. En effet, le pH n'est pas constant dans le temps : il varie un peu et lentement dès qu'on ajoute le zéphirol à la protéine et de façon irrégulière selon la manière de mélanger les solutions (rapidité, proportions...). La présence de sels dans le milieu (sérum total non dialysé) diminue la pente des courbes et par suite la netteté des paliers. Nous ne croyons donc guère à la possibilité de séparer ainsi les diverses globulines. Nous avons étudié plus loin la précipitation des γ -globulines isolées.

Les sels minéraux ont, ici encore, une influence sur la pente des courbes, sur la quantité de zéphirol nécessaire pour avoir précipitation (commençante ou totale), sur la dissolution dans un

excès de zéphirol (courbe 4). Nous avons tracé les courbes au pH du sérum (pH 8) ; la solution fut faite avec du chlorure de sodium à partir de 1 cm³ de sérum amené à une dilution finale de 5 cm³. A pH bas (voisin du point iso-électrique) le rôle du chlorure de sodium est différent, il relargue le complexe, comme il le fait en l'absence de zéphirol, les complexes zéphirol-protéines étant plus facilement relargués que les protéines seules. On ne peut pas tracer les courbes de précipitation du sérum total en l'absence totale de sels, car la dialyse du sérum élimine la fraction euglobulinique.

II. — PRÉCIPITATION DES GLOBULINES γ .

Les globulines γ ont été préparées par précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium à 34 p. 100 de saturation (technique

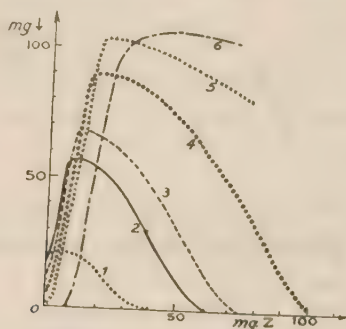


FIG. 5. — 6 pH différents : 4, 7-6, 0-8, 7-9, 3-9, 6-10, 5.

de Cohn). Le précipité est dissous dans de l'eau physiologique et dialysé contre l'eau physiologique (CINa à 0,9 p. 100 dans l'eau bi-distillée) jusqu'à disparition du sulfate d'ammonium.

La solution utilisée contenait 98 mg. de globulines par centimètre cube. Nous avons opéré de la même façon pour le sérum total (le témoin sans zéphirol donne une précipitation de 20 mg. de globulines [euglobulines] dans les conditions décrites, à pH 6,7).

En fonction de la quantité de zéphirol à pH constant, la précipitation se produit à peu près comme dans le cas du sérum total (fig. 5). La comparaison des courbes (1 et 5) ne nous montre que peu de différences essentielles. Notons cependant les points suivants :

1° La précipitation est plus abondante dès les très petites quantités de zéphirol (due à la richesse en euglobulines qui précipitent même sans zéphirol). Mais la présence de zéphirol en petite quantité s'oppose partiellement à la précipitation par simple dilution des euglobulines.

2° La précipitation est à peu près totale pour une quantité de zéphirol assez nettement plus petite.

En fonction du pH les courbes (fig. 6) ressemblent, elles aussi, à celles de la figure 2. Nous constatons aussi la présence d'un palier, que la courbe 7 (maximum de précipitation en fonction du pH [enveloppe des courbes 6]) marque manifestement.

La précipitation débute vers pH 4,3. Le palier qui va de pH 5,7 à pH 8,5 environ semble correspondre à la précipitation de la moitié des globulines γ . Cette fraction précipite de façon progres-

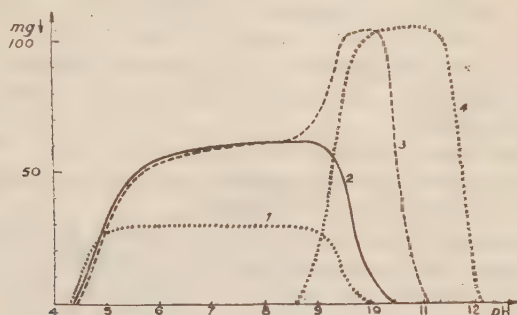


FIG. 6. — 4 quantités différentes de zéphirol : 5 mg.-10 mg.-20 mg.-70 mg.

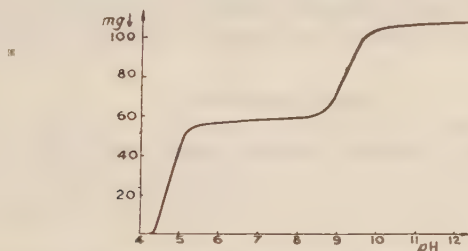


FIG. 7. — Maximum de précipitation en fonction du pH.

sive avec la quantité de zéphirol ajoutée et le précipité est alors proportionnel à la quantité de zéphirol ajoutée. La seconde fraction ne précipite qu'au-dessus de pH 8,5 et pour une teneur en zéphirol dépassant 10 mg. pour 100 mg. de globulines. Cette seconde fraction rappelle le comportement de la sérumalbumine.

La première fraction se redissout facilement dans un excès de zéphirol. Etant donné le pH élevé, la seconde fraction est plus difficile à redissoudre.

Nous concluons de ces expériences que vis-à-vis de la précipitation par le zéphirol, les globulines γ , simplement séparées par le sulfate d'ammonium à 34 p. 100 de saturation, sont hétérogènes.

III. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Lorsque nous opérons sur les globulines totales (précipitées à 51 p. 100 de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, nous retrouvons des courbes analogues à celles que nous venons de tracer pour les globulines γ . Ici encore une première fraction précipite dès pH 4,5 et représente près de la moitié des globulines. La seconde fraction ne précipite qu'au-dessous de pH 8-8,5.

Dans la fraction du sérum non précipitée à 51 p. 100 de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (albumines totales), il y a également une fraction qui précipite par le zéphirol au-dessous de pH 8. Lorsqu'enfin on cristallise plusieurs fois la sérumalbumine, nous avons vu qu'elle précipite alors de façon à peu près homogène au-dessus de pH 7,7.

Nous retrouvons approximativement les courbes de précipitation du sérum total en additionnant les diverses courbes de précipitation dans les mêmes conditions.

Le sérum paraît donc contenir deux sortes de protéines : l'une qui, à la façon de la sérumalbumine, ne précipite qu'à pH supérieur à 7-8 ; l'autre, qui précipite à partir de pH 4,4. La première ne précipite qu'à partir d'une certaine teneur en zéphirol voisine de 0,4 molécule-mg. par gramme de protéine. La seconde précipite proportionnellement à la teneur en zéphirol. Les deux fractions se dissolvent dans un excès de zéphirol.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCHMIDT (K. H.). *Zeitschr. Physiol. Chem.* 1943, 277, 117.

FORMES LEUCOCYTOSIQUES DE LA LEUCOPÉNIE DES CHATS (*)

par V. PAVILANIS.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

On sait que la chute progressive et rapide du nombre des globules blancs dans le sang, est le symptôme caractéristique de la maladie qui a reçu pour cela le nom de *leucopénie infectieuse des chats* [1].

Les noms donnés à l'étranger (*aleucocytosis*, *Aleukozytose der Katzen*, *malignant panleucopenia of cats*) traduisent de même la prédominance clinique du symptôme de la leucopénie.

Au cours de nos travaux [2] nous avons eu l'occasion d'observer plusieurs chats qui, inoculés expérimentalement avec le virus de la leucopénie infectieuse des chats, ont fait une augmentation considérable du nombre des globules blancs. Cette leucocytose, soit pendant la phase aiguë de la maladie, soit pendant la période de guérison, s'est manifestée chez 16 p. 100 des animaux que nous avons examinés.

1° LEUCOCYTOSE SECONDAIRE. — On observe parfois chez les animaux infectés expérimentalement, une leucopénie qui, après la période aiguë ou à la période de guérison, est suivie d'une leucocytose atteignant jusqu'à 85.000 globules blancs par millimètre cube.

a) Exemple : Notre chat n° 145 a fait la maladie de la façon suivante. Il s'agit d'un chat de quatre mois à qui on avait fait une inoculation sous-cutanée de 5 cm³ d'une émulsion diluée à 1 : 40 à l'eau physiologique de la rate du chat 134 qui, lui-même, avait fait une leucopénie expérimentale.

L'observation de ce chat est résumée dans le tableau I.

Le chat est mort le quatorzième jour de la maladie. A l'autopsie on a trouvé une pleuro-pneumonie purulente bilatérale (culture du sang du cœur positive).

L'examen histologique a montré, en plus de la pleuro-pneumonie purulente, une légère dégénérescence graisseuse de la moelle osseuse, mais sans augmentation des polynucléaires dans le tissu,

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1948.

TABLEAU I.

	JOURS DE LA MALADIE				
	2 ^e	5 ^e	7 ^e	9 ^e	12 ^e
Température	39,0	38,6	40,8	40,4	39,8
Nombre de leucocytes par millimètre cube.	16.300	7.500	900	9.600	85.600
<i>Formule leucocytaire pour 100 éléments :</i>					
Myéloblastes					2
Myélocytes				12	1
Métamyélocytes	3			15	6
Polynucléaires :					
Non segmentés				13	20
Neutrophiles	71			25	63
Eosinophiles	1		12	1	
Basophiles				1	
Monocytes	2				3
Lymphocytes	23		88	33	6

augmentation qu'on pouvait attendre dans une leucocytose de 85.000 globules blancs par millimètre cube. La rate et les ganglions lymphatiques ont montré une hyperplasie avec dégénérescence hyalinique dans les centres des follicules. Les autres organes étaient sans lésions.

b) Un autre chat, n° 137, âgé de deux mois, fait aussi une maladie semblable. On lui avait fait une inoculation sous-cutanée avec la même émulsion que le chat n° 145.

Son observation est résumée dans le tableau II.

Le chat a été sacrifié agonisant le quatorzième jour. A l'autopsie on a pu remarquer une pneumonie gauche. Culture du sang du cœur positive.

L'examen histologique a montré une pneumonie fibrineuse avec invasion de polynucléaires et hyperplasie des ganglions lymphatiques et de la rate avec dégénérescence hyalinique des centres des follicules. Les autres organes étaient sans lésions.

2° LEUCOCYTOSE PRIMITIVE. — Mais il arrive aussi que l'on observe parfois chez les chats infectés avec le virus de la leucopénie, au lieu de la leucopénie classique, une leucocytose survenant au contraire dès la fin de l'incubation.

a) C'est le cas, par exemple, du chat n° 116, âgé de deux mois, à qui on a fait une inoculation sous-cutanée de 10 cm³ d'émulsion du foie du chat n° 111, qui avait fait lui-même une maladie expérimentale, dilué à 1 : 50 dans du bouillon ordinaire et filtré sur une membrane de collodion « Gradocol » de 110 mμ. Le virus de la

TABLEAU II.

	JOURS DE LA MALADIE					
	2°	5°	7°	9°	12°	14° agonisant
Température	39,3	39,3	39,4	37,6	38,8	35,0
Nombre de leucocytes par mil- limètre cube	9.000	10.300	7.300	4.000	62.600	30.000
<i>Formule leucocytaire pour 100 éléments :</i>						
Myélocytes					1	
Métamyélocytes					2	
Polynucléaires :						
Non segmentés			8	10	26	13
Neutrophiles	66		79	21	63	76
Eosinophiles	10		1	1		
Basophiles			1			
Monocytes	1		4	5	2	3
Lymphocytes	23		7	63	6	8

leucopénie des chats est d'une taille qui ne traverse pas cette membrane.

Nous avons observé ce chat pendant quinze jours consécutifs ; les changements de température d'un jour à l'autre évoluaient entre 37°4 et 38°5. Le nombre des globules blancs au millimètre cube variait entre 11.700 et 28.500. La formule des éléments blancs était la suivante :

Polynucléaires neutrophiles	Entre 29 et 60
Polynucléaires éosinophiles	Entre 4 et 8
Monocytes	Entre 0 et 3
Lymphocytes	Entre 30 et 65

Tous ces changements journaliers peuvent être considérés comme normaux.

Le quinzième jour nous avons inoculé à ce chat 5 cm³ d'une émulsion à 1:20 dans l'eau physiologique du foie du chat 99, gardé dans la glycérine phosphatée à +4° depuis vingt jours. Le chat 116 a fait une maladie résumée dans le tableau III.

Nous avons continué l'observation de ce chat jusqu'au trente-quatrième jour après la deuxième inoculation ; pendant tout ce temps les variations du nombre de globules blancs par millimètre cube sont restées dans les limites de la normale (entre 9.300 et 22.800).

b) Un autre chat n° 136, âgé de deux mois, a subi une inoculation sous-cutanée de 10 cm³ d'une émulsion du foie du chat 126

TABLEAU III.

	JOURS DE LA MALADIE							
	2 ^e	4 ^e	5 ^e	6 ^e	7 ^e	8 ^e	9 ^e	11 ^e
Température . . .	38,6	38,1	38,9	38,6	38,9	38,6	38,7	38,6
Nombre de leucocytes par millimètre cube.	21.400	19.400	27.400	41.400	64.200	63.000	54.700	25.000
<i>Formule leucocytaire pour 100 éléments :</i>								
Myéloblastes. . . .					1			
Myélocytes					1			
Polynucléaires :								
Non segmentés.			2	2		2		
Neutrophiles . .	49	37	62	32	17	7	14	
Eosinophiles . .	4	2	7	1	1	1	1	
Monocytes	1		1	1	1	1		
Lymphocytes	46	61	28	64	79	89	85	

diluée à 1:50 au bouillon ordinaire et filtrée à travers une membrane de collodion « Gradocol » de 83 μ , retenant le virus.

Nous avons observé ce chat pendant dix-huit jours et constaté une légère hyperthermie entre 38°5 et 40°, qui variait d'un jour à l'autre, une leucocytose entre 20.000 et 42.100 avec la formule leucocytaire suivante :

Polynucléaires neutrophiles	Entre 69 et 84
Polynucléaires éosinophiles	Entre 4 et 13
Monocytes	Entre 1 et 7
Lymphocytes	Entre 7 et 20

Le dix-huitième jour après la première inoculation, le chat a reçu une injection sous-cutanée de 10 cm³ d'une émulsion, diluée à 1:20 à l'eau physiologique, du foie, gardé dans la glycérine phosphatée à + 4° pendant soixante jours, du chat n° 114 qui avait fait une leucopénie expérimentale.

L'observation du chat 136 est résumée dans le tableau IV.

Après l'inoculation le chat a fait une augmentation des globules blancs surtout des polynucléaires neutrophyles. En répétant les inoculations avec la même émulsion et avec l'émulsion dans l'eau physiologique du foie du chat 122, gardé dans la glycérine phosphatée à + 4° pendant quatre-vingt dix jours (virulence éprouvée sur les chats de contrôle n°s 134 et 135), nous avons pu obtenir jusqu'à 91.700 globules blancs par millimètre cube. Dans le sang périphérique nous avons constaté des formes jeunes de la série leucocytaire.

Le chat est sacrifié agonisant le quinzième jour de la maladie et le quatrième jour après la dernière injection.

TABLEAU IV.

	JOURS DE LA MALADIE						
	4 ^e	7 ^e	8 ^e	9 ^e	11 ^e	12 ^e	15 ^e agonisant
Température. . . .	39,5	39,8		38,6	39,3	39,4	36,0
Nombre de leucocytes par millimètre cube.	52.400	51.800		70.000	58.600	91.700	34.300
<i>Formule leucocytaire pour 100 éléments :</i>							
Myéloblastes. . . .			Inoculé avec le foie du chat 114.	4	1	Inoculé avec le foie du chat 122.	3
Myélocytes. . . .				5	3		3
Métamyélocytes. . .				3			5
Polynucléaires :							
Non segmentés. . .	4			17	5		9
Neutrophiles. . .	81			54	65		71
Eosinophiles. . .	5			3	9		3
Basophiles. . .				1	1		1
Monocytes. . . .	3				3		2
Lymphocytes. . . .	7			13	13		3

A l'autopsie nous avons constaté une hypertrophie de la rate et des ganglions lymphatiques du mésentère.

L'examen histologique des organes a révélé la présence d'inclusions acidophiles intranucléaires typiques de la leucopénie infectieuse des chats dans tous les organes. Nous avons constaté aussi une pneumonie catarrhale avec desquamation des cellules alvéolaires et avec inclusions spécifiques dans les cellules monocytaires ; hyperplasie folliculaire de la rate et hyperplasie avec grand œdème des sinus des ganglions lymphatiques.

La rate de ce chat (n° 136) a été inoculée au chat n° 140 et a donné le neuvième jour une leucopénie avec 400 globules blancs par millimètre cube, une lymphocytose relative et les lésions histologiques caractéristiques.

DISCUSSION. — Les observations que nous rapportons montrent que l'on peut observer, dans la leucopénie infectieuse des chats, des formes s'accompagnant de leucocytose parfois très accusée.

Les deux premiers exemples (chats n°s 145 et 137) montrent qu'après la diminution initiale du nombre des leucocytes, ceux-ci réapparaissent rapidement et peuvent atteindre un nombre très élevé. Le mécanisme du phénomène est, dans ce cas, facile à expliquer : à la phase de leucopénie, la résistance de l'organisme est diminuée et des infections secondaires trouvent un terrain favorable à leur développement et à l'éclosion de complications

souvent mortelles : pour les exemples précités, pneumonie dans un cas, empyème dans le second. Dès la phase de reconstitution, la moelle osseuse, obligée de lutter contre l'infection, produit une quantité élevée de globules blancs. Il s'agit au fond d'une leucocytose infectieuse de caractère banal dont le taux élevé peut masquer la leucopénie propre à l'infection causale.

Dans le cas des autres exemples rapportés (chats n° 116 et 136), l'infection de l'animal par le virus de la leucopénie infectieuse n'a été suivie d'aucune diminution du nombre des globules blancs, mais au contraire de l'apparition, au bout de quatre à six jours, d'une leucocytose avec présence de formes jeunes pathologiques dans le sang périphérique. L'examen histologique a montré dans tous les organes les inclusions acidophiles intranucléaires qui sont caractéristiques de la leucopénie infectieuse des chats.

Les auteurs américains Lucas et Riser [3] et nous-même (*loc. cit.*) avons constaté que les inclusions n'apparaissent que pendant la période aiguë de la maladie. A partir du troisième jour de la maladie, on peut les trouver dans le tissu lymphoïde ; au bout de quelque temps elles apparaissent dans les autres tissus et persistent jusqu'à la phase aiguë de la maladie, après quoi elles disparaissent rapidement.

Or, dans l'exemple rapporté, les inclusions abondaient dans les cellules mononucléaires rencontrées en masse dans l'infiltration pneumonique. Il semble probable que la pneumonie elle-même ait été causée par le virus. Les organes du chat 136 étaient virulents et inoculés à d'autres chats ; ils ont provoqué une leucopénie typique.

Nous sommes donc conduit à admettre qu'il existe dans la leucopénie infectieuse, et indépendamment des infections secondaires cause d'une leucocytose incidente, des formes leucocytosiques primitives évoluant sans leucopénie chez l'animal. Cette modification du tableau clinique est peut-être due à une réaction individuelle du sujet réceptif, le virus ne paraissant pas avoir subi de mutation puisque, reporté sur d'autres animaux, il a déterminé chez eux une leucopénie typique.

CONCLUSIONS. — 1° On observe au cours de la leucopénie des chats et chez 16 p. 100 environ des animaux, des formes leucocytosiques accompagnant une maladie par ailleurs typique.

2° Cette leucocytose peut être due à une infection secondaire intercurrente (pneumonie, empyème) entraînant une hyperleucocytose qui domine et masque la leucopénie classique. En ce cas, la maladie débute par une leucopénie qui fait place dans un second temps à la leucocytose accompagnant les complications.

3° Dans d'autres cas, on observe une leucocytose d'emblée, forme de la leucopénie infectieuse dans laquelle le nombre des

globules blancs, au lieu de diminuer, augmente régulièrement. En ce cas, on observe dans les organes des inclusions nucléaires typiques de la maladie traduisant la présence du virus qui, reporté sur d'autres animaux, se manifeste par la leucopénie habituelle. Plus difficile à expliquer que les premières et tenant peut-être à une susceptibilité individuelle, les formes leucocytosiques ou leucémiques de la leucopénie infectieuse des chats paraissent présenter un grand intérêt à la fois théorique et pratique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.). Leucopénie infectieuse des chats, in C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE, *Les ultravirus des maladies animales*, Maloine, 1943.
- [2] PAVILANIS (V.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1046.
- [3] LUCAS (A. M.) et RISER (W. A.). *Am. J. Path. a. Bact.*, 1945, **21**, 435,

ACTION DE L'OXYGÈNE SUR LES ANAÉROBIES STRICTS

par M. GRUNBERG.

(Institut de Biologie Physico-chimique. Service du prof. E. Aubel.)

I. — Mise en évidence dans le milieu de croissance de *Cl. saccharobutyricum* de deux systèmes d'oxydo-réduction, l'un de $E'_0 = -0,050$ v. ; l'autre de $E'_0 = -0,120$ v. à pH 6,2 à 37°.

II. — Influence de diverses substances sur la valeur du potentiel d'arrêt de *Cl. saccharobutyricum* et recherche du mécanisme de leur action.

INTRODUCTION

On a montré [Aubel (E.), Rosenberg (A. J.) et Grunberg (M.)¹] [2], que *Cl. saccharobutyricum* et *Cl. sporogenes* (anaérobies stricts), se défendent contre l'oxygène en dégageant des substances réductrices en quantité d'autant plus grande que les bactéries sont plus nombreuses. Il s'ensuit :

1° Qu'il y a une relation nette entre la quantité de bactéries et la quantité d'oxygène que l'on doit envoyer pour maintenir le potentiel de la culture à une valeur donnée.

2° Que dans certaines limites la valeur du potentiel d'arrêt est d'autant plus élevée que la quantité de bactéries est plus grande (voir courbe 1, fig. 1).

Ce n'est donc pas la valeur même du potentiel d'oxydo-réduction du milieu extérieur qui joue le rôle principal dans le développement des anaérobies stricts. Toutefois, au-dessus de + 0,180 v. pH 6,2, aucun développement n'est possible, quelle que soit la quantité de bactéries.

Néanmoins, les valeurs des potentiels d'arrêt trouvées dans différentes conditions expérimentales, sont concordantes, elles dépendent à un même pH (1) de la vitesse d'arrivée de l'oxygène et de la quantité du complexe bactéries + substances réductrices.

Les bactéries supportent un potentiel plus élevé lorsqu'on leur ajoute du filtrat de culture : le liquide d'une culture active privé

(1) Dans certaines limites, la valeur du potentiel d'arrêt varie en fonction du pH, résultats non publiés (voir courbes 1 et 2, fig. 1). On ne peut faire des expériences que jusqu'à une augmentation d'opacité de 30. En effet, à partir de ce moment, le pH du milieu baisse au fur et à mesure de la croissance des bactéries et atteint les mêmes valeurs, quel que soit le pH initial du milieu.

de bactéries par centrifugation dans un milieu sans oxygène (2) (nommé jusqu'ici extrait de culture [Aubel (E.), Rosenberg (A. J.), Grunberg (M.)] [2] et, réciproquement, les bactéries privées des substances sécrétées ont un potentiel d'arrêt décalé vers des potentiels plus bas.

Le filtrat de culture active également la croissance des bactéries en anaérobiose et peut diminuer la durée de leur phase d'induc-

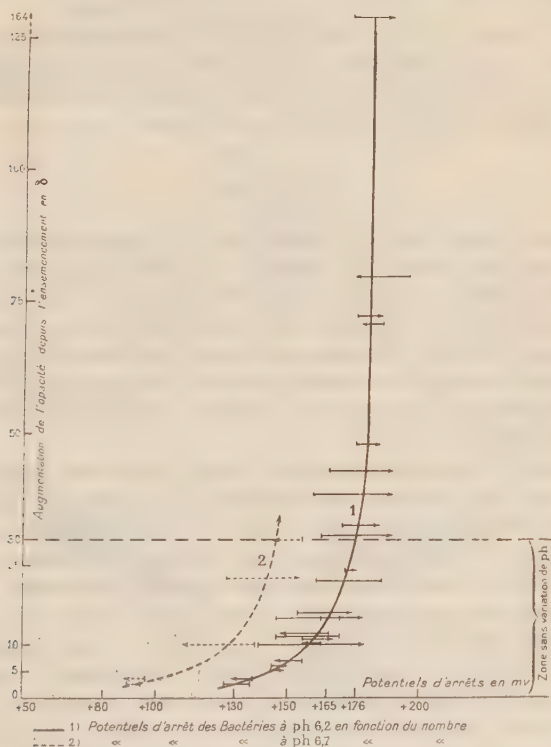


FIG. 1.

tion : quand on ensemence 35 cm³ de milieu VF avec 0,5 cm³ de bactéries actives, aucun développement de *Cl. saccharobutyricum* n'a lieu durant les sept premières heures.

Si l'on ajoute immédiatement après l'ensemencement 5 à 6 cm³ de filtrat actif, il se produit une croissance deux ou trois heures après, comme dans les expériences habituelles où l'ensemencement était de 2 cm³ pour 35 cm³.

(2) Nous avons centrifugé les bactéries dans un milieu privé d'oxygène, c'est-à-dire simplement dans le tube où elles ont poussé, puis ouvert avec précaution ce tube et prélevé le liquide immédiatement.

Réciproquement, le développement des bactéries séparées des substances sécrétées est retardé.

La durée de la phase d'induction dépend donc en grande partie des substances libérées par les bactéries dans leur milieu de culture. On ne peut attribuer l'influence du filtrat à une baisse de potentiel car, bien qu'il s'en produise une quand on ajoute le filtrat, elle est momentanée; au bout de quelques minutes le potentiel du milieu remonte à sa valeur initiale.

Dans ce travail nous avons cherché à déterminer la nature des substances actives du filtrat et le mécanisme de leur influence sur la valeur du potentiel d'arrêt et sur la durée en anaérobiose de la phase de latence de *Cl. saccharobutyricum*.

TECHNIQUES.

Les expériences ont été faites avec *Cl. saccharobutyricum* (3) cultivé dans le milieu de viande, foie VF préparé suivant la technique de Prévot et Boorsma [17] et auquel on ajoute 5/60 d'extrait de pomme de terre [voir Aubel (E.), Rosenberg (A. J.) et Grunberg (M.)] [2]. L'ensemencement des fioles d'expérience est toujours fait à partir de culture de dix-huit heures en milieu liquide provenant d'un tube de pomme de terre après plusieurs passages sur le milieu expérimenté.

Pour réduire le plus possible la phase d'induction, onensemence largement (2 cm³ pour 35 cm³ de milieu, le poids sec des bactéries est d'environ 800 γ) avec des cultures où le dégagement gazeux est abondant et les bactéries non encore déposées. Dans ces conditions, la croissance ne dure que sept à huit heures.

Pour cultiver les bactéries, nous avons utilisé le dispositif d'Hewitt [6] modifié; à la partie supérieure des deux branches en U de la fiole d'expérience, on a simplement soufflé deux boules, afin d'arrêter la mousse qui se forme quand on fait passer un fort courant de gaz dans le milieu de culture (fig. 2).

Pour stabiliser le potentiel dans les cultures bactériennes à des niveaux différents, nous avons employé une méthode dérivant de celle de Knight [12]. On envoie dans le milieu de culture un mélange d'azote pur et d'air comprimé dont la vitesse est réglée de façon à obtenir un potentiel déterminé. Pour éviter les contaminations, l'air est purifié par un passage dans l'acide sulfurique concentré et dans l'eau distillée stérile. L'avantage de cette méthode est la facilité avec laquelle on peut contrôler les pourcentages d'air du mélange.

La valeur du potentiel est donnée par la méthode électro-

3) La souche provenait de la collection de M. Legroux, chef de Service à l'Institut Pasteur; nous tenons à le remercier ici.

métrique classique ; nous avons utilisé l'amplificateur et le potentiomètre Meci (Paris).

Pour chaque expérience, les lectures sont faites en double, deux électrodes plongeant dans le milieu de culture.

Si l'agitation du milieu est homogène et les électrodes de platine choisies avec précaution, les différences des résultats données par les deux électrodes ne s'écartent pas plus de 5 milli-

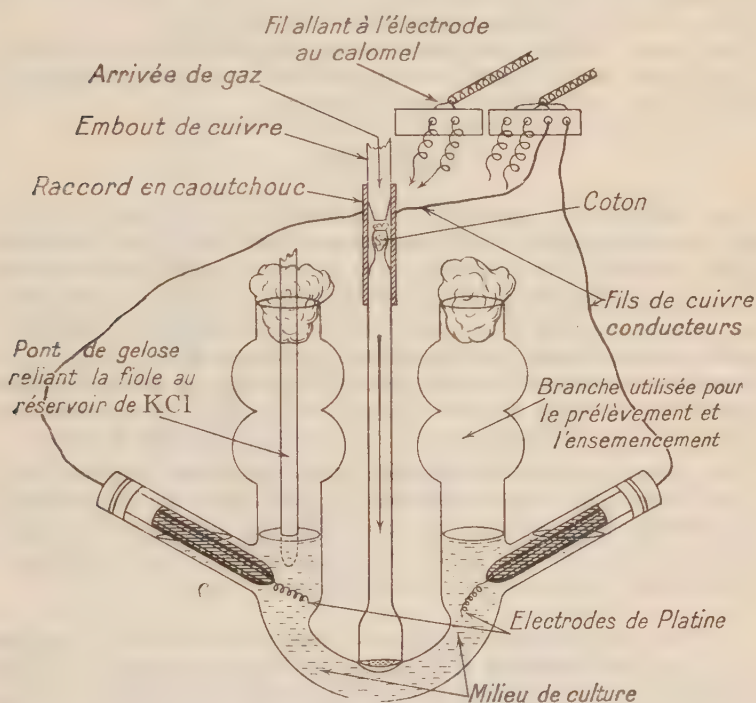


FIG. 2.

volts. La forme de l'électrode de platine, la longueur et le diamètre du fil doivent être déterminés soigneusement pour avoir des mesures concordantes. L'électrode qui nous a donné les meilleurs résultats est obtenue avec un fil de platine brillant, de 2,5 cm. de longueur, de 0,35 mm. de diamètre, enroulé en spirale. Il arrive parfois que les électrodes soient empoisonnées malgré les diverses précautions. Il faut alors faire subir un traitement spécial au milieu de culture [Aubel (E.), Rosenberg (A. J.), Grunberg (M.)] [2].

Pour mesurer le pH on prélève stérilement pendant sa croissance 3 cm³ de culture. Il est impossible de suivre la variation de pH en plongeant l'électrode de verre dans le milieu de culture, car les bactéries adhèrent à l'électrode et faussent les mesures.

La croissance des bactéries est suivie par la mesure de l'opacité du milieu au moyen de l'électrophotomètre de Meunier, car la variable intéressante n'est pas le nombre d'individus, mais la quantité de substance vivante. Les résultats exposés dans ce travail sont exprimés en divisions du tambour de l'appareil de Meunier (les lectures sont faites avec un écran vert, la densité optique pour cet écran de 100 divisions du tambour est 0,33). Pour être dans de bonnes conditions de dilution, on prélève 2 cm³ de la culture, qu'on dilue dans 3 cm³ du milieu VF.

Pour mesurer l'opacité dans les milieux de culture contenant un colorant, nous oxydons toujours par quelques minutes de passage d'air, le colorant avant la mesure.

EXPÉRIENCES.

Pour chercher la nature des substances actives dans le filtrat, nous avons regardé si ces substances favorisant les synthèses, étaient détruites par la chaleur. On a donc chauffé au bain-marie bouillant pendant dix minutes les bactéries à l'abri de l'oxygène, dans le tube où elles ont poussé, puis on a centrifugé et prélevé le liquide comme dans les expériences précédentes (v. Aubel (E.), Rosenberg (A. J.) et Grunberg (M.) [2]). Quand on ajoute le filtrat chauffé, on ne note aucune baisse de potentiel et le filtrat ne montre aucune influence sur la valeur du potentiel d'arrêt.

Les substances actives du *filtrat* sont donc très fragiles : elles se détruisent par simple agitation à l'air et par chauffage dans le vide. Nous avons cherché alors si d'autres substances ne pourraient pas favoriser les synthèses et avoir des effets identiques à ceux du filtrat sur la valeur des potentiels d'arrêt.

A. RÔLE DE LA LACTOFLAVINE. — Nous avons d'abord remplacé dans nos expériences le filtrat par de la lactoflavine. L'action stimulante de la lactoflavine avait été notée en 1939 par Prévot (A. R.) et Boorsma (H. J.) [48] sur la toxinogénèse tétanique. Or, les bactéries butyriques sont connues comme des micro-organismes les plus riches en flavines (13,5 mg. p. 100 de la substance sèche) et nous avons mis en évidence *in vivo* la protéoflavine et la lactoflavine.

En effet, lorsqu'on suit l'évolution du potentiel du milieu VF ou du milieu semi-synthétique (4) (milieu de Knight [43] modifié) au

(4) Milieu de Knight modifié :

Tampon de phosphate M/15 : 30 cm ³ KH ₂ PO ₄ , 20 cm ³ Na ₂ HPO ₄	50 cm ³
Hydrolysat de gélatine à 10,5 p. 100	8 cm ³
Tryptophane	10 g.
Extrait de touraillons à 10 p. 100	5 cm ³
Glucose	1 g.
Eau distillée	60 cm ³

cours de la croissance de *Cl. saccharobutyricum* en anaérobiose. on observe sur presque toutes les courbes une nette inflexion à $E_h = -0,050$ v. à pH 6,25. Cette inflexion varie suivant les expériences entre $-0,040$ v. et $-0,050$ v. à pH 6,25 (courbes 1 et 2, fig. 3). Quelquefois l'inflexion se transforme en palier (courbe 3, fig. 3).

Il existe donc dans le milieu où croissent les bactéries, un

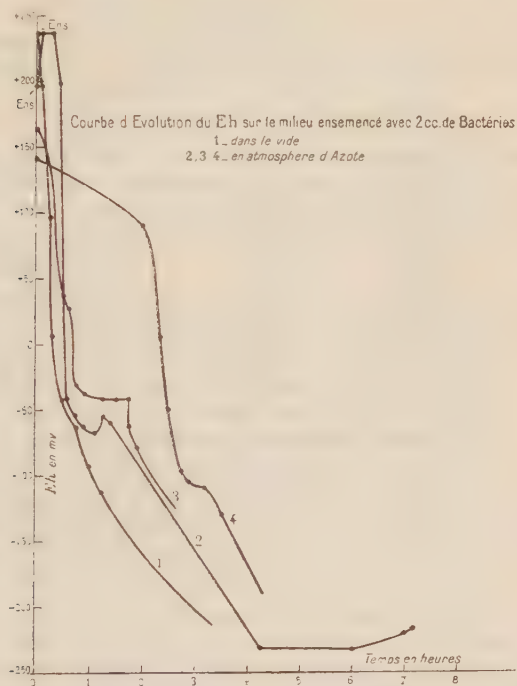


FIG. 3.

système d'oxydo-réduction de $E'_0 = -0,050$ v., pH 6,25, ce qui a d'ailleurs été noté (Aubel (E.), Rosenberg (A. J.), Grunberg (M.) [2]). Ce système serait à rapprocher de celui que Wurmser et Filitti-Wurmser [23] ont signalé dans le suc de Lebedeff et qui est celui de la protéoflavine, dont E'_0 a pour valeur $-0,050$ v. à pH 6,5 et à 25° .

Dans les conditions de nos expériences, à 37° et à pH 6,25, E'_0 de la protéoflavine aurait pour valeur $-0,045$ v., valeur très voisine de celle que nous avons trouvée. Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur de celles déterminées par Kuhn et Boulanger [14] pour le potentiel de demi-réduction de la protéoflavine.

Nous pensons donc qu'il existe dans le milieu de croissance de *Clostridium saccharobutyricum*, de la protéoflavine.

Quand la croissance des bactéries est ralentie et que la chute de potentiel n'est pas immédiate après l'ensemencement (courbe 4, fig. 3), l'inflexion se déplace vers des valeurs plus basses : — 0,110, — 0,120 v. à pH 6,2 et, dans les cas où la crois-

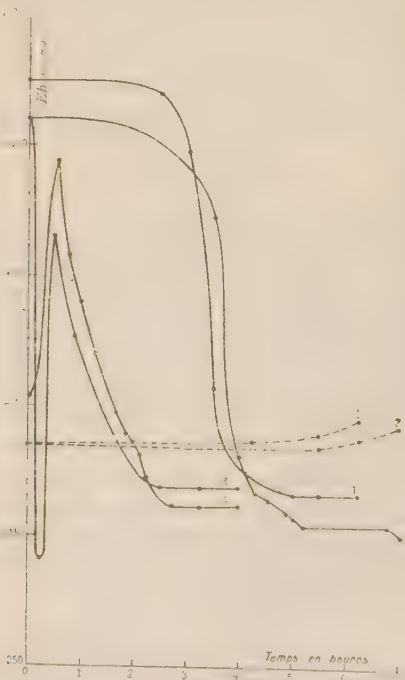


FIG. 4. — Evolution du potentiel en atmosphère d'azote, sur le milieu VF ensemencé avec 2 cm³ de bactéries (1, 2). Courbe de croissance correspondante de *Cl. saccharobutyricum* (1', 2'). Evolution du potentiel, en atmosphère d'azote, sur le milieu VF auquel on ajoute 800 γ de lactoflavine et qu'on ensemence avec 2 cm³ de bactéries (3, 4).

sance de *Cl. saccharobutyricum* est tellement ralentie que la phase d'induction dure cinq heures au lieu de deux (courbes 1, 2, fig. 4). L'inflexion se transforme en un palier à un potentiel de — 0,120, — 0,142 v. à pH 6,2 à 38°, valeur voisine de celle déterminée par Kuhn et Boulanger [14], pour le potentiel de demi-réduction de la lactoflavine — 0,148 v., pH 6,2. Pour vérifier que le palier correspond à la lactoflavine, on suit l'évolution du potentiel dans le milieu VF, que nous ensemençons avec 2 cm³ de bactéries très actives, et auquel nous ajoutons 800 γ de lactoflavine. On retrouve

le palier observé précédemment — 0,110, — 0,130 v., pH 2, qui correspond donc bien à la lactoflavine (courbes 3 et 4, fig. 4).

Il faut remarquer que dans le milieu VF additionné de lactoflavine, on observe un deuxième palier — 0,140, — 0,200 v., qui n'est pas marqué sur les courbes 3 et 4, mais ces valeurs ne peuvent être considérées comme exactes. En effet au niveau de ce palier, la croissance des bactéries a commencé et il y a une variation de pH du milieu de 6,2 à 5,6. Or, il faut un certain temps à un système pour entrer en équilibre, on ne peut guère avoir de valeurs exactes de l'équilibre du système, si le pH du milieu est en continuel changement.

Il ressort donc, de l'examen des courbes d'évolution du E_h qu'il existe dans les milieux de croissance de *Cl. saccharobutyricum* deux systèmes, l'un correspondant à la protéoflavine, l'autre à la lactoflavine. Ils sont peut-être en équilibre. Chaque fois qu'il y a ralentissement de croissance, ou autolyse, cet équilibre est déplacé dans le sens lactoflavine.

Nous insistons beaucoup sur la mise en évidence *in vivo*, de la protéoflavine et de la lactoflavine à l'état libre, qui doivent jouer un rôle important dans le métabolisme de *Cl. saccharobutyricum*. La protéoflavine, comme Wurmser [23] l'a noté, tamponne les cellules à un potentiel qui correspond à des équilibres importants, intervenant dans la synthèse des acides aminés, en particulier à celui de l'alanine avec ses produits d'oxydation.

Il faut remarquer aussi que ce potentiel est de l'ordre du potentiel d'arrêt de croissance des anaérobies, — 0,060 v. à pH 7, signalé autrefois par Aubel et Aubertin [4].

Nous avons donc ajouté, à 37 cm³ de milieu, 1 cm³ d'une solution de lactoflavine à 100 γ par centimètre cube dans de l'eau distillée stérile, et répété les expériences où l'on étudiait l'influence du filtrat sur la valeur du potentiel d'arrêt : on suit la croissance des bactéries dans l'azote pur puis, à différents stades de la croissance durant la phase logarithmique, on envoie un mélange d'air et d'azote dont on règle l'arrivée, de façon à bloquer le développement. La lactoflavine est ajoutée au moment où l'on envoie le mélange gazeux destiné à arrêter la croissance. On mesure alors le potentiel correspondant à cet arrêt de croissance. On détermine deux valeurs de potentiel, celle pour laquelle la croissance est très ralentie et celle où il n'y a nettement plus de croissance (comme *Cl. saccharobutyricum* est très facilement autolysable, dès que la croissance s'arrête, l'opacité diminue). Il est en effet impossible de saisir de façon précise le moment exact où cesse la croissance.

Ce sont ces deux valeurs qui sont réunies par une droite horizontale dans les courbes des figures 5 et 1 ; quand on ne détermine qu'une seule valeur, la flèche indique la direction du potentiel d'arrêt.

Il faut remarquer qu'il est très difficile de maintenir le potentiel à des valeurs élevées quand on ajoute de la lactoflavine. Il faut envoyer un pourcentage d'air très fort et le potentiel a tendance à descendre en quelques minutes vers des valeurs de l'ordre de $E_h = -0,050$ v., pH 6,2 ce qui correspond au E'_0 de la protéoflavine.

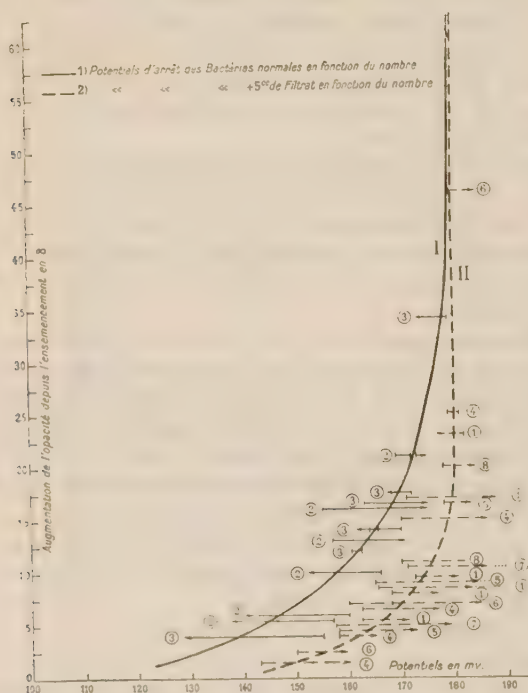


FIG. 5. — Valeurs des potentiels d'arrêt trouvées quand on ajoute au milieu :

Lactoflavine.	1
Sodium 2, 6-dichlorobenzénone-indophénol $E'_0 = + 0,217$ volts pH 7.	2
Orthophénol-indophénol $E'_0 = + 0,205$ volts pH 7.	3
1-naphtol-2-Na-sulfonate-indophénol $E'_0 = + 0,123$ volts pH 7.	4
Bleu de méthylène $E'_0 = + 0,011$ pH 7.	5
Phénosafranine $E'_0 = - 0,252$ pH 7.	6
Méthylviologène $E'_0 = - 0,446$ volts pH 7.	7
Glutathion.	8

La lactoflavine, plus encore que les substances contenues dans le filtrat, protège les bactéries de l'oxydation, favorise les synthèses et permet donc la croissance à l'air.

Les valeurs des potentiels d'arrêt trouvées (fig. 5), se placent sur la courbe 2, figure 5, qui indique, dans les expériences où on ajoute le filtrat, les potentiels d'arrêt en fonction des bactéries développées après l'ensemencement.

Donc, en présence de lactoflavine, aussi bien que de filtrat, les bactéries peuvent se développer, pour un même nombre de bactéries et un même pH, à un potentiel plus élevé que dans les expériences sans filtrat.

Un exemple est donné par les courbes (fig. 6) : pour une augmentation d'opacité de 8, à $E_h = + 0,167$ v., pH 6,2, il se produit une croissance si l'on ajoute de la lactoflavine (C 5) ; pour la même augmentation d'opacité à $E_h = + 0,160$ v., il n'y a aucune croissance dans l'expérience témoin (C 2).

On n'observe pas immédiatement une baisse de potentiel quand on ajoute de la lactoflavine au milieu, mais c'est parce qu'elle est sous sa forme oxydée. Dès qu'elle est réduite par les bactéries, le potentiel a tendance à descendre vers des valeurs plus basses.

La lactoflavine agirait-elle sous forme de lactoflavine libre ou se transformerait-elle en protéoflavine ?

Il semble qu'elle pourrait agir à l'état libre, puisque nous l'avons mise en évidence sous cette forme chez les bactéries.

La lactoflavine est un transporteur d'hydrogène. N'est-ce pas une des raisons pour lesquelles elle favorise les synthèses qui se ramènent, en somme, à des réductions ? Aussi, avons-nous étudié l'influence de différents transporteurs d'hydrogène sur la valeur du potentiel d'arrêt.

B. — ACTION DES COLORANTS A DIVERS POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION. — Nous avons ajouté, dans les mêmes conditions que précédemment, 1 cm³ de colorant M/1.000 pour 35 cm³ de milieu ; la concentration finale du colorant est environ 1/100.000. Le colorant n'est pas stérilisé mais simplement dissous dans de l'eau distillée stérile et filtré avant d'être ajouté.

Les colorants utilisés sont (B. D. H. indicator) :

	E'_0 pH7 en volts
Sodium-2,6-dichlorobenzénone indophénol	+ 0,217
Orthophénol indophénol $E'_0 = + 0,109$ volts à pH6, ce qui donne à pH7 environ.	+ 0,205
1-naphtol-2-sodium sulfonate indophénol.	+ 0,123
Bleu de méthylène.	+ 0,011
Phénosafranine.	- 0,252
Méthyl viologène.	- 0,446

Tous les colorants pouvant servir de transporteurs d'hydrogène dans les conditions de l'expérience, sont actifs et ont la même influence sur le potentiel d'arrêt que le filtrat de culture de bactéries.

Les résultats expérimentaux sont donnés par la figure 5, seuls se sont montrés inactifs les colorants à E'_0 pH 7 supérieurs à + 0,200 v., comme l'orthophénol-indophénol ($E'_0 = + 0,205$ v. pH 7) et le sodium 2,6-dichlorobenzénone-indophénol $E'_0 = + 0,217$ v. pH 7. Ces colorants sont, en effet, toujours sous leur

forme réduite dans les conditions de l'expérience, puisque le potentiel du milieu est toujours maintenu à une valeur inférieure à $E_h = + 0,180$ v. pH 6,2, aussi ne peuvent-ils servir de transporteurs d'hydrogène et n'ont-ils aucune influence sur la valeur du potentiel d'arrêt. Nous nous étions assuré que ces colorants n'étaient pas toxiques pour les bactéries : la croissance de *Cl. saccharobutyricum* se produit normalement dans le vide, lorsqu'on ajoute ces colorants à la même concentration que dans les expériences précédentes et les courbes de croissance en atmosphère d'azote sont les mêmes en présence ou en absence de colorant.

Le 1-naphto-1,2-sodium-sulfonate-indophénol ($E'_0 = + 0,123$ v. pH 7) dont E'_0 serait environ $+ 0,171$ v. à pH 6,2 (condition de l'expérience) s'est montré actif. Mais, c'est aux environs de E'_0 de cet indophénol que se trouve la limite à laquelle les colorants ont une influence sur le potentiel d'arrêt, car le pourcentage d'air nécessaire pour maintenir le potentiel du milieu aux valeurs hautes comme $+ 0,167$ v. est très faible. Cet indophénol, en effet, est presque complètement sous sa forme réduite, aussi seule une très petite partie peut servir de transporteur d'hydrogène.

Les colorants à potentiels bas comme le méthylviologène se sont montrés actifs ; cela s'explique probablement ainsi : ces colorants, quoique partiellement réduits, s'oxydent tellement vite qu'ils peuvent néanmoins servir de transporteurs d'hydrogène.

Comme Barron et Hoffman [3] l'ont noté, le pouvoir catalytique du colorant dépend de la vitesse de sa réduction par la cellule et de son oxydation par l'oxygène.

Un exemple du rôle des colorants dans la croissance de *Cl. saccharobutyricum* aux potentiels élevés est donné par la figure 6 pour chaque colorant.

Pour une augmentation d'opacité de 8 à $+ 0,164$ v., il y a une croissance quand on ajoute le bleu de méthylène (courbe 6) ; pour la même augmentation d'opacité à $+ 0,160$ v., on ne note aucune croissance dans les expériences témoins (courbe C 2).

Pour une augmentation d'opacité de 10 :

	E'_0 pH7, E_h	CROISSANCE	NUMÉRO de la courbe
Témoin	$+ 0,164$	—	3
Na-2-6-dichlorobenzène indophénol	$+ 0,217 + 0,164$	—	7
Orthophénol indophénol	$+ 0,205 + 0,167$	—	8
1-naphtol-2-Na-sulfonate-indophénol	$+ 0,123 + 0,169$	+	9
Phénosafranine	$- 0,232 + 0,168$	+	10
Méthylviologène	$- 0,446 + 0,171$	+	11

Done, quand on ajoute des colorants qui peuvent servir de transporteurs d'hydrogène dans les conditions de l'expérience, les bactéries peuvent se développer pour un même pH et un même nombre de bactéries, à un potentiel plus élevé que les bactéries témoins. Il faut noter que les colorants indicateurs de potentiels d'oxydo-réduction ont une action sur la fermentation de quelques bactéries anaérobies (A.-R. Prévot et J. Taffanel [19]).

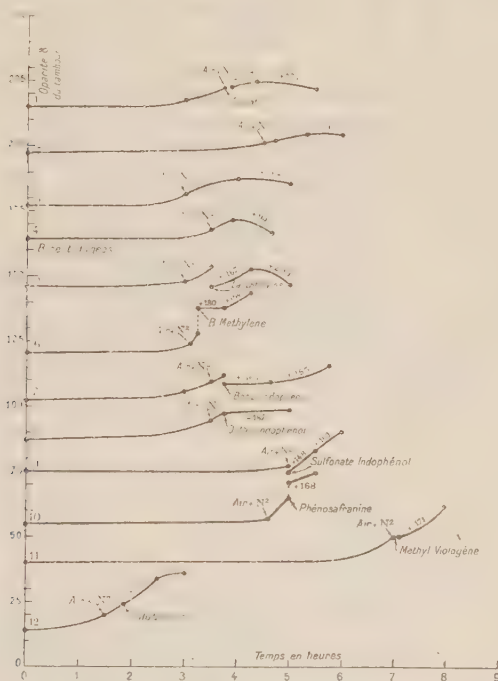


FIG. 6. — Etude de la croissance de *Cl. saccharobutylicum* aux potentiels élevés, lorsqu'on ajoute diverses substances au milieu de culture. L'opacité initiale du milieu était environ la même dans toutes les expériences, mais les courbes sont décalées pour la commodité du dessin. Les substances sont toujours ajoutées pour une augmentation d'opacité de 8 ou de 10.

C. ACTION DU GLUTATHION. — Il était à prévoir que le rôle des substances contenant des groupements —SH serait très important dans le métabolisme des anaérobies. Ils peuvent servir de transporteurs d'hydrogène, et leur influence dans la croissance de ces bactéries en présence d'oxygène, avait été déjà notée en 1898 par Trenkman [22] et, depuis, par Aubel et Aubertin, (1927) [4], Hosoya [8], Quastel et Stephenson [20] qui ont vu que les corps à groupement —SH diminuent la durée de la phase

de latence de *Cl. sporogenes* en anaérobiose et permettent, d'autre part, sa croissance à l'air. Chaix et Fromageot [4] ont montré qu'en ajoutant des substances — SH au milieu de culture glucosé des bactéries propioniques, le métabolisme de ces bactéries en aérobie devient le même qu'en anaérobiose ; les substances — SH protègent l'oxydation globale du glucose.

Rapkin [21] admet que, dans l'effet Pasteur, l'oxydo-réduction entre le phosphoglycérate et le pyruvate est bloquée par oxydation de composés — SH. En effet, l'enzyme qui catalyse cette oxydo-réduction est inactivé par les composés G. S.-S. G.

Hopkins et Morgan [7] ont vu l'influence des composés à groupement —SH sur l'activité des déshydrogénases : la succino-déshydrogénase est inhibée par le glutathion oxydé ; son activité réapparaît quand on lui ajoute des composés —SH.

Les substances —SH doivent également jouer un rôle dans le métabolisme de *Cl. saccharobutyricum* car elles ont été mises en évidence chez ces bactéries. Les bactéries centrifugées, lavées plusieurs fois pour les débarrasser de l'acétone sont mises en suspension dans de l'eau distillée et chauffées jusqu'à ébullition avec quelques gouttes d'acide acétique normal pour dénaturer les protéines ; on alcalinise avec l'ammoniaque, on ajoute du sulfate de magnésium à saturation et quelques gouttes de nitroprussiate à 25 p. 100. On obtient une coloration rose violacée, caractéristique des composés —SH.

Nous avons ajouté dans les conditions des expériences précédentes, à 35 cm³ du milieu de culture, 1 cm³ d'une solution de glutathion dans l'eau distillée, stérile ; la concentration finale en glutathion était de 0,01 p. 100.

On observe immédiatement une légère baisse de potentiel qui passe de $E_h = + 0,136$ v. pH 6,2 à $E_h = + 0,071$ v. pH 6,2 ; il est impossible de faire remonter le potentiel à des valeurs plus élevées, même si on augmente le pourcentage d'air jusqu'à supprimer complètement l'azote dans le mélange gazeux. A cette concentration, le glutathion s'oppose à l'action oxydante de l'air. Nous avons alors diminué la quantité de glutathion jusqu'à la concentration de 0,005 p. 100.

Le glutathion, alors, a une nette influence sur les valeurs du potentiel d'arrêt. Les bactéries se développent pour un même nombre de bactéries, et un même pH à des potentiels plus élevés que les bactéries témoins (fig. 5) et les valeurs du potentiel d'arrêt se placent sur la courbe 2 (fig. 5).

Pour une augmentation d'opacité de 10 à $E_h = + 0,178$ v. pH 6,2 on a une bonne croissance (C 12 à comparer avec la courbe des bactéries témoins et les courbes 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, fig. 6).

Il faut noter que, quelle que soit la quantité ajoutée de bactéries,

de filtrat ou de transporteurs d'hydrogène, il est impossible d'obtenir des cultures quand le potentiel dépasse $E_h = + 0,180$ v. à pH 6,2 (fig. 6). Ce chiffre est à rapprocher de celui de Kanel [9] et c'est également celui pour lequel la fermentation est bloquée 100 p. 100 dans les expériences d'Engelhardt [5] sur l'effet Pasteur.

DISCUSSION.

L'ensemble de tous ces résultats nous semble s'expliquer ainsi :

Pour que la croissance des bactéries puisse se faire dans les conditions normales de culture, c'est-à-dire en anaérobiose, il faut que les bactéries forment d'abord une quantité suffisante de substances réductrices et de transporteurs d'hydrogène nécessaires aux synthèses. La phase de latence est le temps nécessaire à la formation de ces substances. Parmi celles-ci se trouvent probablement des corps à groupement — SH et des flavines qui, en plus de leur rôle comme transporteurs d'hydrogène, doivent intervenir dans la synthèse des protéines. Aussi, précédant la croissance on observe toujours une baisse de potentiel correspondant à la formation de ces substances et caractéristique du métabolisme des anaérobies (elle est observée sur différents milieux et dans diverses conditions de culture). Il faut donc noter que la baisse de potentiel qui précède la croissance des anaérobies stricts n'est que le résultat de la formation de substances qui seront utilisées pour les synthèses, et non une cause de leur croissance par simple action physico-chimique du milieu (5).

Quand on ajoute du filtrat, des substances à groupement — SH ou de la lactoflavine au milieu de culture, les synthèses et par conséquent la croissance, se font plus vite puisqu'on apporte alors les substances qui leur sont nécessaires, aussi la durée de la phase de latence est-elle diminuée.

Mais seul, le filtrat d'une culture de bactéries jeunes est actif, donc les substances nécessaires aux synthèses se détruisent, s'oxydent à la fin de la croissance des bactéries.

Cette explication montre clairement le rôle de l'âge des bactéries et de la quantité de semence pour le développement des anaérobies. Quand onensemence largement, on ajoute, d'une part, plus de substances actives, d'autre part, plus de bactéries qui en produisent, aussi la croissance est-elle rapide. Lorsqu'onensemence avec des bactéries non proliférantes, les substances actives sont oxydées et le temps d'induction correspondant à leur

(5) Ce ne peut être une évolution simple du milieu, car lorsque les bactéries, pas assez actives, ne se développent pas, nous n'avons jamais observé dans les conditions de l'expérience une baisse de potentiel du milieu, mais au contraire une remontée : en anaérobiose le potentiel du milieu se stabilise à $E_h = + 0,170$ v., pH 6,5.

formation est beaucoup plus long ; c'est pourquoi on observe un retard de croissance qui est quelquefois très grand.

Quand on envoie de l'oxygène dans un milieu où se trouvent des bactéries anaérobies, celles-ci créent autour d'elles une zone de défense formée par l'hydrogène et les substances réductrices qu'elles libèrent. Si la quantité d'oxygène est relativement faible, d'un part, l'oxygène est neutralisé, d'autre part, s'il reste suffisamment d'hydrogène et de métabolites nécessaires aux synthèses, la croissance se produit. Si la quantité d'oxygène est trop forte, la zone de défense est forcée, tout l'hydrogène et les métabolites nécessaires aux synthèses sont oxydés, et les synthèses ne se produisant plus, la croissance devient impossible. En outre, à des potentiels plus élevés que $+ 0,180$ v. à pH 6,2, la perméabilité des cellules pourrait changer, et l'oxygène pénétrant alors à l'intérieur des cellules, détruit partiellement ou totalement certains enzymes et crée un potentiel incompatible avec les synthèses. Il faut insister sur le fait noté précédemment (E. Aubel, A. J. Rosenberg, M. Grunberg [2]) qu'on ne peut tirer aucune conclusion des mesures effectuées soit à l'aide d'électrodes, soit à l'aide de colorant en ce qui concerne le potentiel d'oxydo-réduction à l'intérieur des cellules et des variations qu'il peut subir. En effet, lorsque le potentiel est obtenu en anaérobiose à l'aide du ferricyanure (Knaysi et Dutky [14]) ou du bleu de crésyl (Plotz et Gélosio [16]), ni le colorant ni le ferricyanure ne pénètrent à l'intérieur des cellules (E. Aubel, A. J. Rosenberg, M. Grunberg [2]).

Bien que le niveau d'oxydo-réduction mesuré dans le milieu de croissance des anaérobies au moment de l'arrêt, ne donne aucune indication sur la valeur du potentiel d'arrêt à l'intérieur des cellules, il n'en reste pas moins déterminé par la compétition entre l'oxygène et les produits du métabolisme bactérien. La croissance des bactéries anaérobies stricts dans certaines limites de potentiels, inférieurs à $+ 0,180$ v., pH 6,2, dépend du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, parce que celui-ci indique l'activité électronique du milieu et par conséquent la quantité de substances réductrices présentes. Ainsi peut-on expliquer les valeurs variables de potentiel d'arrêt obtenues par différents auteurs, elles dépendaient des conditions de culture.

Quand on ajoute, au milieu de culture en présence d'oxygène, des substances réductrices transportant l'hydrogène ou du filtrat de culture, on empêche d'abord l'oxydation des métabolites produits par les bactéries nécessaires à leurs synthèses, l'oxygène ne peut arriver jusqu'à la cellule. D'autre part, en pénétrant à l'intérieur des cellules et en facilitant le transport d'hydrogène, les substances accélèrent les synthèses cellulaires, par conséquent la croissance est plus rapide et les bactéries sont bientôt en assez

grand nombre pour se défendre contre l'oxygène : c'est pourquoi, même si les substances ajoutées initialement au milieu sont oxydées, les bactéries peuvent continuer leur croissance en présence d'oxygène. Il n'est donc pas nécessaire, lorsqu'on veut avoir un développement des anaérobies à l'air, d'ajouter des substances réductrices en forte concentration au milieu de culture. Cela explique d'une part les résultats de Kliger et Guggenheim [40], montrant que la vitamine C à faible concentration 0,02 p. 100 est suffisante pour assurer la croissance de *Cl. welchii* à l'air, et d'autre part, ceux de Messing [45]. Cette dernière a observé qu'employés à une faible concentration, 0,02 p. 100, les corps à groupements — SH n'abaissent pas le potentiel du milieu utilisé pour ses expériences, mais permettent pourtant la croissance en aérobiose de *Cl. saccharobutyricum*.

Ainsi, l'étude de l'évolution du potentiel et du pH dans les conditions normales de croissance (Aubel (E.), Rosenberg (A. J.), Grunberg (M.) [2]) et la recherche de la valeur du potentiel d'arrêt ont permis non seulement d'expliquer le rôle de l'oxygène sur les anaérobies stricts, mais encore le mécanisme de leur phase de latence.

Il serait souhaitable que cette étude, combinée avec les méthodes chimiques, soit employée plus souvent lorsqu'on veut étudier le métabolisme bactérien. La connaissance de l'évolution du potentiel et du pH est particulièrement importante dans l'étude du métabolisme intermédiaire, car elle a l'avantage d'être faite dans les conditions les plus physiologiques possibles, au cours de la croissance des bactéries dans les conditions normales, et elle peut aider à comprendre les mécanismes respiratoires ou fermentatifs encore obscurs et à trouver les corps intermédiaires du métabolisme, dont la recherche est souvent difficile par voie chimique.

Je suis heureuse de pouvoir remercier ici M. le professeur E. Aubel pour l'intérêt constant et la direction compréhensive qu'il m'a témoignés au cours de mes recherches et je tiens à remercier également M. A. J. Rosenberg, chargé de recherches, pour ses conseils journaliers et ses suggestions judicieuses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUBEL (E.) et AUBERTIN (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 1729.
- [2] AUBEL (E.), ROSENBERG (A. J.) et GRUNBERG (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **224**, 190 ; *Helv. chim. Acta*, 1946, **29**, 1267.
- [3] BARRON (E. S. G.) et HOFFMAN (L. A.). *Physiol.*, 1930, **43**, 483.
- [4] CHAIX (P.) et FROMAGEOT (C.). *Enzymol.* 1939, **6**, 33.
- [5] ENGELHARDT (W. A.) et SAKOV (N. E.). *Biochimia*, 1943, **8**, 35.
- [6] HEWITT (L. F.). *Oxydation-réduction potentials in bacteriology and biochemistry. London County Council*, 1933 (2^e ed.).

- [7] HOPKINS (F. G.) et MORGAN (R. J.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 611.
- [8] HOSoya (S.). *Sc. Rep. Tohoku Imp. Univ.*, 1925, **4**, 103.
- [9] KANEL (E. S.). *Microbiol.*, 1937, **6**, 254, tirage 2.
- [10] KLIGER (J.) et GUGGENHEIM (E.). *J. Bact.*, 1938, **35**, 141.
- [11] KNAYSI (G.) et DUTKY (S. R.). *J. Bact.* 1936, **31**, 137.
- [12] KNIGHT (B. C. J. G.). *Biochem. J.*, 1930, **42**, 1066.
- [13] KNIGHT (B. C. J. G.). *Medical Research Council, Special Report*, Ser. n° 210, London 1936, 109.
- [14] KUHN (R.) et BOULANGER (P.). *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1936, **69**, 1657.
- [15] MESSING (W. A.). *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1894.
- [16] PLOTZ (H.) et GELOSO (J.). *Ces Annales*, 1930, **45**, 613.
- [17] PRÉVOT (A. R.) et BOORSMA (H. J.). *Ces Annales*, 1939, **36**, 601.
- [18] PRÉVOT (A. R.) et BOORSMA (H. J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1254 : *C. R. Soc. Biol.* 1939, **131**, 468.
- [19] PRÉVOT (A. R.) et TAFFANEL (J.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 450.
- [20] QUASTEL (J. H.) et STEPHENSON (M.). *Biochem. J.*, 1936, **20**, 1125.
- [21] RAPKINE (L.). *Biochem. J.* 1936, **32**, 1729.
- [22] TRENMANN (D^r). *Zentrabl. Bakt.*, I, 1898, **23**, 1038.
- [23] WURMSER (R.) et FILITTI-WURMSER (S.). *Enzymol.*, 1937, **4**, 137.

MÉTHODE AMÉLIORÉE DE RECHERCHE ET DE DOSAGE DE PETITES QUANTITÉS DE MÉTHANOL

par GABRIEL BERTRAND et L. SILBERSTEIN.

Dans nos études sur la variation de la teneur en méthanol, ou alcool méthylique, contenu à l'état d'ester dans le bois [1], nous nous sommes servis d'une méthode proposée autrefois par Denigès [2], déjà modifiée en quelques points par l'un de nous, en collaboration avec G. Brooks [3] et que nous avons dû améliorer encore pour la rendre à la fois plus sensible et plus exacte.

Cette méthode, ainsi améliorée, pouvant rendre des services dans un grand nombre de circonstances : recherches sur les bois et les pailles, sur les composés pectiques, sur les fermentations des substances végétales, etc., nous avons pensé être utiles en la décrivant ici.

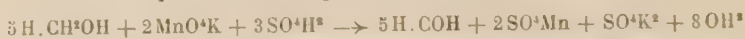
Rappelons d'abord que cette méthode repose sur trois réactions chimiques successives : dans la première, on oxyde le méthanol en aldéhyde formique par le permanganate de potassium en milieu acide ; dans la deuxième, on détruit l'excès de réactif oxydant par réduction à l'aide d'acide oxalique ; dans la troisième, on fait réagir une solution de fuchsine décolorée par l'acide sulfureux, ou réactif de Schiff sur la solution d'aldéhyde formique, ce qui donne peu à peu naissance, dès la température ordinaire, à une belle matière colorante violet-rouge dont on apprécie la quantité au colorimètre.

L'ensemble des trois réactions ci-dessus est très bon au point de vue de la mise en évidence du méthanol ; il caractérise assez bien ce composé [4] dans un produit de distillation et permet d'enceler des quantités inférieures au milligramme.

Par contre, il n'en est pas de même au point de vue du dosage : des causes d'erreur importantes existent dans la première et dans la troisième réaction.

Lorsqu'on oxyde le méthanol, on doit, pour atteindre la totalité de ce corps présent dans la solution que l'on analyse, ajouter un excès de permanganate, excès qui intervient aussi pour accélérer la vitesse de l'opération. Or, l'action du réactif oxydant ne porte pas exclusivement sur le méthanol ; bien que plus lentement, elle se porte aussi sur l'aldéhyde formique qui finirait par disparaître sous forme d'eau et d'acide carbonique si l'on insistait plus qu'il

convient. Le rendement en aldéhyde formique n'est donc pas conforme à l'équation théorique :



il lui est toujours inférieur ; au cours de l'expérience, il passe par un maximum et diminue d'autant plus qu'il reste un plus grand excès de permanganate et que l'action de celui-ci est prolongée davantage. Enfin, ces variations s'accomplissent d'autant plus vite que la température du mélange en réaction est plus élevée. La concentration en ions hydrogène, c'est-à-dire, dans le cas actuel, en acide sulfurique ajouté, peut également intervenir sur le processus oxydatif. Pour ces diverses raisons, il est nécessaire de déterminer par des expériences préalables les conditions physiques et chimiques de la réaction considérée, de manière à atteindre un rendement aussi constant et aussi comparable que possible dans chaque dosage.

Mentionnons tout de suite que nous avons reconnu avantageux de ne pas réaliser la réaction d'oxydation aussi rapidement qu'il avait été proposé jusqu'ici. Au lieu de verser dans la solution aqueuse de méthanol additionnée de permanganate de potassium un grand excès d'acide sulfurique concentré, qui n'intervient pas seulement comme facteur chimique de la réaction, mais chauffe fortement le liquide, nous employons beaucoup moins d'acide, et seulement sous la forme diluée : la température du mélange est alors à peine modifiée et nous poursuivons l'essai en portant ce mélange, dans un bain-marie, à une température modérée et constante, celle de + 35°. Dans l'échauffement un peu brutal produit, selon la technique primitive, par l'addition d'acide concentré, la température atteinte (de 70 à 90 degrés) dépend beaucoup du degré d'hydratation de l'acide : en outre, la vitesse de refroidissement du mélange en réaction, qui se produit au seul contact de l'air, varie notablement de l'hiver à l'été. Dans notre nouveau mode opératoire, ces causes importantes de variations sont pratiquement éliminées. On laisse réagir exactement cinq minutes — au lieu de deux à trois — avant de faire intervenir l'acide oxalique, toujours à + 35° jusqu'à décoloration complète. Les rendements en aldéhyde formique sont alors tout à fait voisins d'un essai à un autre.

En ce qui concerne la troisième réaction, il faut retenir que la production de la matière colorante, par l'action réciproque de l'aldéhyde formique et de la fuchsine sulfitee, est plutôt lente : elle exige deux à trois heures pour atteindre son maximum à la température ordinaire du laboratoire, puis elle disparaît peu à peu dans les heures suivantes. Au lieu de la laisser s'accomplir, comme antérieurement, par abandon du mélange final sur la table, c'est-à-dire à une température qui peut différer de 10 à 20° suivant

la saison et, fréquemment, de 5 à 10° dans la même journée, nous l'effectuons au sein du bain-marie, à température constante. Les expériences comparatives que nous avons exécutées à ce sujet nous ont montré qu'après trente minutes, la coloration a déjà atteint environ 80 p. 100 de son intensité optima, que cette dernière n'est acquise qu'après une heure et demie à deux heures et qu'elle se maintient alors presque sans diminution durant trois à quatre heures.

En apportant à la méthode de dosage les modifications dont les principes viennent d'être exposés et en utilisant un électrophotomètre pour la mesure colorimétrique finale, nous avons augmenté d'une manière importante sa précision. D'autre part, en faisant intervenir des proportions de réactifs notablement plus petites que dans les modes opératoires précédents, où elles étaient très supérieures à celles qui sont théoriquement nécessaires, nous avons augmenté aussi la sensibilité, au moins dans le rapport de un à dix.

Voici maintenant, avec les principaux détails, comment nous opérons pour réaliser la recherche et le dosage d'une petite quantité de méthanol par la méthode améliorée que nous proposons.

MATÉRIEL. — Comme tubes pour exécuter les réactions, nous continuons d'utiliser les tubes à essai bouchés à l'émeri qui nous avaient servi jusqu'à présent, c'est-à-dire d'environ 25 cm³ de capacité et 20 mm. de diamètre, munis d'un bouchon de verre soufflé bien ajusté par rodage à l'émeri. Chaque tube est marqué d'un numéro gravé, ainsi que son bouchon. Il porte en outre deux traits de jauge, à 10 et à 20 cm³, qui étaient très utiles lorsque nous opérons sur 10 cm³ de liquide final et par comparaison directe avec une gamme de tubes témoins contenant des quantités connues et croissantes de méthanol. Maintenant que nous mesurons les quantités de matière colorante formées à l'aide d'un électrophotomètre, les traits de jauge ne servent plus : le volume final de liquide coloré est porté seulement à 4 cm³ et, pour obtenir le maximum de précision, les mesures sont faites avec des pipettes dont le calibrage a été vérifié par pesée. Nous nous servons de pipettes d'un cm³ divisées en dixièmes, moins coûteuses et plus pratiques pour le travail courant que les micropipettes divisées en centièmes.

Divers modèles de bains-marie ou de cuves à eau dont la température est réglable entre 35 et 40° peuvent convenir, à condition d'y adapter un support permettant de tenir les tubes plongés seulement de quelques centimètres dans l'eau tiède ; les tubes ne renfermant que 4 cm³ de mélange à réaction ne pourraient, sans cela, rester en équilibre. En cas de besoin, si l'on n'a qu'un petit nombre d'expériences à faire, on peut se servir d'un grand gobe-

let de verre ou d'une boîte de fer blanc et l'on maintient la température voulue avec une petite flamme, réglée à la main. Les tubes sont alors tenus en place à l'aide d'un morceau de fil de fer dont une extrémité est enroulée deux ou trois fois autour d'un tube et l'autre, repliée en crochet, repose sur le bord du récipient.

Le moment venu d'évaluer la coloration, on verse le liquide dans une petite cuve de verre à faces parallèles et l'on examine à l'électrophotomètre sur 10 mm. d'épaisseur.

MÉTHANOL-TÉMOIN. — Le méthanol servant à établir la gamme-étalon doit être exempt de substances capables d'intervenir sur le titrage, en particulier de composés aldéhydiques. On le prépare en faisant bouillir au réfrigérant ascendant de l'alcool méthylique pur du commerce pendant quelques heures avec quelques centièmes de son poids de potasse et de baryte ; lorsqu'une portion distillée d'un ou deux cm^3 ne donne plus de coloration avec le réactif de Schiff, on rectifie à la colonne et on met en réserve la fraction de cœur comme méthanol-témoin.

SOLUTION PERMANGANIQUE. — On prépare une solution-mère de permanganate de potassium à 10 g. par litre que l'on garde en réserve. Quand on s'apprête à faire un dosage, on en verse 3 cm^3 dans un tube ou dans une petite fiole et l'on y ajoute 0,2 cm^3 d'acide sulfurique pur.

ACIDE OXALIQUE. — On se sert d'acide pur en solution aqueuse à 8 g. pour 100 cm^3 .

FUCHSINE SULFITÉE OU RÉACTIF DE SCHIFF. — Pour préparer ce réactif, il faut porter d'abord son attention sur la qualité de la fuchsine. Il existe plusieurs matières colorantes artificielles de couleur rouge, vendues parfois sous le nom de fuchsine, bien qu'elles n'en soient pas formées ; le commerce offre quelquefois aussi des fuchsines mélangées de substances étrangères qui laissent une coloration parasite après l'action de l'acide sulfureux. On doit donc veiller à prendre de la fuchsine vraie, cristallisée, entièrement soluble dans l'eau et dans l'alcool, et complètement décolorable à la température ordinaire par addition d'acide sulfureux. Nous nous servons depuis une dizaine d'années d'un produit connu dans le commerce sous le nom de « fuchsine diamant ».

On dissout à chaud 1 g. de fuchsine dans un litre d'eau distillée, on laisse refroidir et on ajoute 7 à 8 g. de bisulfite de sodium sec dissous dans 25 à 30 cm^3 d'eau ou 15 cm^3 de solution commerciale de ce sel à 36-40° Bé. Après un quart d'heure ou une demi-heure de contact, on additionne de 18 à 20 cm^3 d'acide chlorhy-

drique pur de densité 1,19. On abandonne quelques jours dans une armoire ou, du moins, à l'abri de la lumière, puis on enlève en partie l'excès de SO^2 en maintenant le flacon sous le vide d'une trompe à eau pendant une demie à une journée. Après quarante-huit heures de conservation à l'obscurité, la solution, qui a dû rester incolore ou jaune paille, est bonne pour l'usage. Un excès de SO^2 nuit à la sensibilité du réactif, c'est pourquoi on l'élimine, mais si on laisse trop longtemps sous vide, le réactif se recolore et on doit le ramener à la décoloration en le traitant de nouveau par une petite quantité de bisulfite : 1 à 2 deg., suivant la teinte.

Le réactif réagit de plus en plus lentement en vieillissant, aussi l'avons-nous renouvelé toutes les deux à trois semaines durant les premières recherches. Dans la suite, nous avons reconnu qu'il pouvait se conserver deux et même trois mois, à l'abri dans une armoire.

GAMME COLORIMÉTRIQUE. — On prépare, par pesée, une solution aqueuse renfermant 0,5 mg. de méthanol par centimètre cube (la moitié de la proportion indiquée antérieurement). Un dixième de centimètre cube correspond ainsi à 0,050 mg. ou 50 γ de méthanol.

Les mesures colorimétriques ne se faisant plus par comparaison directe, mais à l'électrophotomètre, il suffit de préparer des gammes de quelques tubes seulement. On prend, par exemple, trois tubes dans lesquels on verse respectivement 0,1 cm^3 , 0,2 cm^3 et 0,3 cm^3 de la solution titrée de méthanol et on complète à 1 cm^3 avec de l'eau distillée.

Pour ce qui est du liquide, ou des liquides à analyser on mesure des volumes connus dans autant de tubes qu'il est nécessaire pour qu'il y ait au moins un tube pour chaque échantillon qui contienne, dans 1 cm^3 une quantité de méthanol comparable à celle de l'un des tubes de la gamme-étalon, soit une quantité comprise entre 40 à 50 γ au minimum et 200 à 300 γ au maximum.

Si, comme c'est le cas le plus fréquent, on a une idée de la proportion du méthanol contenue dans un liquide à analyser, cet ajustage n'offre aucune difficulté et l'on arrive même, avec les trois tubes de la gamme et un seul tube de liquide à analyser, à la détermination quantitative que l'on désire. Dans le cas, au contraire, où l'on n'a aucune idée de la concentration, cette première mesure sert à fixer les conditions d'une seconde qui apporte la solution définitive.

OXYDATION DU MÉTHANOL EN ALDÉHYDE FORMIQUE. — On doit l'effectuer à température constante, à l'aide d'un bain-marie maintenu, par exemple, à + 35°. Cette condition est facilement réalisable dans les laboratoires de la région parisienne. Dans une

région plus méridionale, on peut être obligé, l'été, d'adopter une température un peu plus élevée pour le réglage du bain-marie, soit 37 ou 38°. Cette petite augmentation de température accélère légèrement l'action du réactif mais, toutes les conditions restant comparables elle ne modifie pas les résultats des dosages.

Les tubes, tant de la gamme-étalon que ceux renfermant le ou les liquides à analyser, sont tout d'abord placés cinq à dix minutes dans le bain-marie pour qu'ils y atteignent la température de 35°. On place, en même temps, dans le bain-marie, la solution de permanganate de potassium à 1 p. 100, additionnée d'acide sulfurique ainsi que celle d'acide oxalique.

Très posément et très régulièrement alors, on ajoute dans chaque tube 0,3 cm³ de permanganate, on agite et replace dans le bain-marie.

Après exactement cinq minutes d'action du réactif oxydant, on ajoute 0,1 cm³ de la solution oxalique, on agite et remet le mélange dans le bain-marie. Après environ deux minutes, l'excès de permanganate est réduit et la décoloration est complète.

REACTION DE SCHIFF. — On a mis depuis cinq à dix minutes au bain-marie à 35° une petite quantité de solution décolorée de fuchsine. On ajoute maintenant 2,6 cm³ de cette solution au premier des tubes, on agite et replace dans le bain-marie, et l'on continue de la même manière aussi régulièrement que possible, le traitement de chacun des autres tubes.

Denigès prescrivait d'ajouter, en même temps que le réactif de Schiff, environ 10 p. 100 en poids d'acide sulfurique. Selon nos expériences, la forte acidité qui résulte de cette addition diminue très notablement l'intensité de la réaction colorée, sans présenter ici en compensation aucun avantage ; c'est pourquoi nous la supprimons.

CHRONOMÉTRAGE DES OPÉRATIONS. — On perdrait une grande partie de l'avantage dû à la régularisation de la température pendant les transformations du méthanol en aldéhyde formique, puis en matière colorante, si on ne s'appliquait pas, en même temps, à fixer une durée égale de réaction dans chaque tube : cinq minutes pour l'oxydation permanganique, davantage pour la réaction de Schiff.

Il faut donc avoir un chronomètre sous les yeux et noter l'heure de l'addition du permanganate pour arrêter cette action exactement cinq minutes après, avec l'acide oxalique et, un peu plus tard, l'heure de l'addition de la fuchsine, afin de passer le liquide coloré à l'électrophotomètre quand le moment est venu.

MESURE COLORIMÉTRIQUE. — Il n'est pas nécessaire d'attendre que la coloration ait acquis tout son développement pour effectuer

la mesure colorimétrique. Lorsque la coloration, en effet, a atteint après trente minutes, environ 80 p. 100 de son intensité maxima, elle n'augmente plus que très lentement et comme, d'autre part, le temps de verser le contenu d'un tube en expérience dans la cuve de l'électrophotomètre, de procéder à la mesure et d'en noter le résultat, ne dépasse guère une minute à une minute et demie, on se trouve déjà dans de bonnes conditions d'évaluation. Rien n'empêche d'attendre un degré plus avancé de coloration, jusqu'à une heure ou une heure et demie, mais, pratiquement, cela n'augmente pour ainsi dire pas la précision et dépense, par contre, beaucoup plus de temps. En outre, comme le réactif de Schiff, dilué et laissé au contact de l'air, s'oxyde lentement et prend déjà en une heure une légère coloration rose, il faut préparer un tube-témoin sans méthanol, afin de pouvoir tenir compte de la correction qu'il y a lieu de faire.

SENSIBILITÉ. — La méthode est très sensible. Si, dans un but qualitatif, on applique la série des réactions décrite plus haut, en opérant dans un petit tube de 9 à 10 mm. de diamètre [5], à 0,2 cm³ d'une solution aqueuse renfermant 0,1 mg. de méthanol et même seulement à 0,1 cm³ ne contenant que 0,004 mg. de cet alcool, solution à laquelle on ajoute successivement 1 goutte de permanganate, puis une goutte d'acide oxalique et, enfin, respectivement, 0,5 cm³ ou 0,3 cm³ de réactif de Schiff, on peut obtenir une coloration violet-rose, apparaissant après dix à quinze minutes et très nette après une demi-heure. Un tube témoin préparé sans méthanol ne donne encore aucune coloration.

PRÉCISION. — On peut se rendre compte du degré de précision quantitative de la méthode en comparant entre eux les résultats obtenus dans plusieurs séries de dosages sur des quantités connues de méthanol. Voici les déviations lues sur l'échelle de notre électrophotomètre de Meunier [6] dans cinq séries consécutives de

TABLEAU I.

	AVEC		
	0,050 mg.	0,100 mg.	0,150 mg.
Série 1	65,5	98,0	131,5
Série 2	65,0	98,5	130,0
Série 3	65,0	97,5	130,5
Série 4	64,5	97,5	130,0
Série 5	65,0	98,0	131,0
En moyenne . . .	65,0	97,9	130,6

dosages portant sur 0,050 mg., 0,100 mg. et 0,150 mg. de méthanol.

Si l'on exprime les résultats de ce tableau par un graphique sur papier quadrillé, on obtient une courbe se confondant à très peu près avec une droite, ce qui permet de considérer les déviations données par l'échelle de l'électrophotomètre comme proportionnelle aux concentrations.

Lors des dosages, on peut donc, pour convertir les degrés de l'instrument en poids de méthanol, ou bien consulter le graphique ou bien tenir compte qu'entre 0,050 mg. et 0,150 mg. chaque degré correspond à la présence d'une quantité de méthanol de 0,00152 mg. dans la prise d'essai.

La correspondance entre les degrés de l'électrophotomètre et les quantités de méthanol ne persiste pas quand ces quantités s'abaissent au-dessous de 0,050 mg. et surtout de 0,030 mg. Aussi, lorsque dans un dosage, on trouvera un poids de méthanol inférieur à 0,050 mg., faudra-t-il recommencer l'expérience avec une prise d'essai contenant le double ou le triple de la quantité d'abord mise en jeu, si l'on tient à obtenir la meilleure précision dont la méthode est susceptible.

Nous avons indiqué qu'une addition d'acide sulfurique au mélange d'aldéhyde formique et de réactif de Schiff diminuait très notablement l'intensité de la réaction colorée. Voici, à l'appui de cette assertion, les résultats obtenus dans une série d'essais, réalisés dans les mêmes conditions que ceux du tableau I. mais avec addition, en même temps que de fuchsine sullitée, d'acide sulfurique à raison de 2 p. 100 au mélange final :

TABLEAU II.

	AVEC		
	0,050 mg.	0,100 mg.	0,150 mg.
Série 1.	46,0	66,5	87,0
Série 2.	46,5	66,0	86,0
Série 3.	45,75	65,5	86,5
Série 4.	47,0	65,5	85,5
Série 5.	46,0	66,5	86,0
En moyenne . . .	46,25	66,0	86,2

La comparaison des chiffres de ce tableau avec ceux du précédent montre que la sensibilité de la réaction de l'aldéhyde formique avec la fuchsine sullitée est diminuée d'à peu près un tiers par l'addition de l'acide sulfurique. Elle est aussi un peu moins précise.

En résumé, la méthode améliorée de recherche et de dosage que nous venons de décrire permet, non seulement de caractériser le méthanol en opérant sur des quantités aussi petites qu'un centième et même un demi-centième de milligramme, mais elle rend possible, lorsqu'on dispose des réactifs nécessaires, de doser cet alcool en trois quarts d'heure à une heure, avec une approximation d'environ un centième. Ce dernier résultat obtenu dans des conditions courantes de travail avec des pipettes d'un cm³ divisées en dixièmes, est, en général, tout à fait satisfaisant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ces *Annales* 1947, **73**, 575.
- [2] *C. R. Acad. Sci.* 1910, **450**, 529, et DENIGÈS, CHELLE et LABAT, *Précis de Chimie analytique*, 6^e édit. 1931, **2**, 175.
- [3] *Ann. Ferment.*, 1940, **5**, 537 ou *Ann. agron.*, 1940, **10**, 349.
- [4] On peut confronter à ce sujet : H. SCHIFF, *C. R. Acad. Sci.* 1867, **64**, 182 et *Zeitschr. f. Chemie* 1867, 175 ; Gust. SCHMIDT, *Ber. d. deut. chem. Ges.* 1880, **13**, 2342 et 1881, **14**, 1848 ; CARO (dans Gust. SCHMIDT, *ibid.*) et A. VILLIERS et M. FAYOLLE, *Bull. Soc. chim.* 1894, **11**, 692.
- [5] Les tubes dits à hémolyse, à ouverture élargie en entonnoirs sont très commodes pour cet usage : ils sont très faciles à maintenir dans l'eau d'un petit bain-marie avec un fil de fer (voir à : matériel).
- [6] Sans correction de la déviation due à un tube témoin préparé à partir d'eau distillée non additionnée de méthanol. Avec notre appareil cette déviation, due à l'influence de la cuve et du liquide témoin, était en moyenne de 33°5. Avec un réactif de Schiff d'une autre préparation, les déviations pourraient être un peu différentes. Elles ne sont valables que pour la provision de réactif alors utilisée.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE
(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 8 janvier 1948.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

**RAPPORTS ENTRE LES MICROFLORES FIXATRICES
ET CELLULOLYTIQUES**

par R. CHALAUST.

Après la constatation, faite par Winogradsky, que seuls les *Azotobacter* sont, dans des conditions oecologiques normales sous un climat tempéré, responsables de la fixation de l'azote atmosphérique, l'intérêt du problème de la nutrition carbonée de ces germes suscita de nombreuses recherches.

C'est vers la cellulose, source hydrocarbonée la plus importante dans le sol, que s'orientèrent assez rapidement ces recherches, et l'on pensa à une symbiose plus ou moins stricte entre cellulolytiques et fixateurs (Winogradsky) puisque les *Azotobacter* ne peuvent utiliser directement cette cellulose.

Vandecaveye et Villanueva (1) constatent un gain d'azote nitrique et d'*Azotobacter* sur une terre enrichie en cellulose après cent cinquante jours.

Reprenant au laboratoire l'expérience de Vandecaveye et Villanueva, légèrement modifiée (couches minces de terre enrichie à 0,5 p. 1.000 de cellulose), Pochon et Tchan (2) constatent une augmentation de la teneur en azote total, allant de 1,5 p. 1.000 à 2,25 p. 1.000 après un mois d'incubation à 30°. D'autre part ils notent également un accroissement très net de la teneur en *Azotobacter* et cellulolytiques.

Dans le but de confirmer l'hypothèse d'une symbiose entre cellulolytiques et *Azotobacter*, les mêmes auteursensemencent simultanément des plaques de silicogel à la cellulose selon la technique de Wino-

(1) VANDECAVEYE et VILLANUEVA, *Soil Sci.*, 1934, 191.

(2) POCHON et TCHAN, *Ces Annales*, 1946, 72, 824.

gradsky avec une souche cellulolytique aérobie du genre *Cytophaga* et une souche d'*Azotobacter*.

Ils constatent alors, après vingt jours d'incubation à 30°, que le papier filtre est couvert de la gelée mucilagineuse caractéristique du genre *Cytophaga* et qu'au sein de cette gelée se développent de petites colonies d'*Azotobacter*. Ainsi se trouve démontrée au laboratoire la symbiose directe entre les *Azotobacter* et les cellulolytiques aérobies,

ÉCHANTILLON	<i>Cytophaga</i>	<i>Azotobacter</i>
	Nombre de grains de terre fertiles p. 100	Nombre de grains de terre fertiles p. 100
<i>Sables éoliens :</i>		
1	40	28
3	38	53
4	50	97
5	24	22
7	58	91
9	4	0
<i>Limon gris :</i>		
10	40	64
11	68	90
12	58	97
13	60	97
14	96	97
15	36	36
16	36	47
<i>Pliocène supérieur :</i>		
17	20	9
18	28	30
19	12	8
20	20	27
<i>Crau :</i>		
26	4	10
27	0	7
28	14	20
29	12	20
30	24	44
31	38	91

sans l'intermédiaire d'autres bactéries associées, comme certaines théories le laissaient supposer.

Nous avons alors pensé que l'existence d'*Azotobacter* dans le sol était liée à la présence de germes cellulolytiques aérobies de différents types, peut-être surtout de *Cytophaga*, et que cette hypothèse devait être vérifiée dans le sol.

Dans ce but, nous avons étudié systématiquement la répartition des *Azotobacter* et des germes cellulolytiques dans des échantillons de terre de Camargue, prélevés dans les régions suivantes :

- 1^o Région d'Aigues-Mortes, le Crau du Roi, pour les sables éoliens.
- 2^o Région de Marsillargues pour le limon gris alluvionnaire.
- 3^o Région de Bouillargues pour le pliocène supérieur.
- 4^o Région de Saint-Martin-de-Crau pour les terrains de la Crau.

Les prélèvements ont été faits en surface avec la technique classique. La richesse en germes cellulolytiques et fixateurs de la terre est évaluée selon la technique de Winogradsky utilisant les plaques de silicogel :

1. Plaques au papier filtre Durieu 111, sans cendres,ensemencées avec 25 grains de terre pour la détermination des cellulolytiques ;

2. Plaques au pyruvate de soude,ensemencées avec 50 grains de terre, pour la détermination des *Azobacter* (Pochon et Tchan).

Par la méthode de Winogradsky nous avons mis en évidence, qualitativement et quantitativement la présence de germes cellulolytiques, parmi lesquels nous avons constaté une très nette dominance de *Cytophaga*, alors que les germes mobiles, en particulier le genre *Cellvibrio*, sont peu abondants dans nos échantillons.

Nous constatons des variations sensiblement parallèles pour les taux des *Cytophaga* et des *Azotobacter*.

Dans le but de confirmer l'existence de cette association nous avons enrichi de la terre de Beauce avec de la cellulose (papier filtre ou sciure de bois), afin de faire monter le taux des cellulolytiques aérobies et de voir s'il y aurait également une augmentation du taux des *Azotobacter*.

1^{er} essai : Terre enrichie avec du papier filtre et humidifiée à 20 p. 100.

2^e essai : Terre enrichie avec de la sciure de bois à 1 p. 100 humidifiée à 20 p. 100.

3^e essai : Témoin constitué par de la terre humidifiée à 20 p. 100.

Après mise à l'étuve un mois et demi, nous trouvons un enrichissement en germes cellulolytiques et en particulier en *Cytophaga*, accompagné d'un accroissement sensible en *Azotobacter*.

De même nous constatons une augmentation de la teneur en azote (voir tableau ci-dessous) :

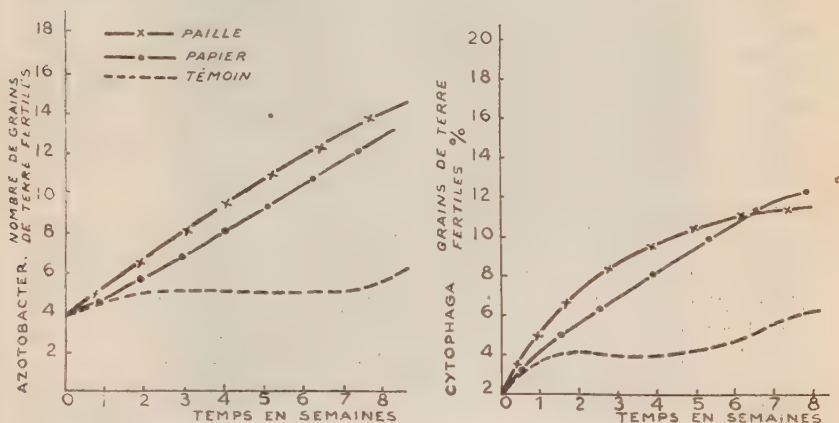
	N Avant	N Après	<i>Azotobacter</i> Avant	<i>Azotobacter</i> Après	<i>Cytophaga</i> Avant	<i>Cytophaga</i> Après
Témoin	1,154	1,1	40	38	55	72
Papier filtre	1,134	1,3	40	95	55	95
Bois	1,154	1,25	40	97	55	92

Une autre expérience plus précise, effectuée dans des conditions à peu près identiques, nous a permis de suivre dans le temps la progression des phénomènes de cellulolyse et de fixation d'azote par la teneur en germes cellulolytiques et fixateurs, évalués suivant la technique de Winogradsky d'une part, et par le dosage de l'azote total d'autre part.

Cette expérience a été effectuée sur un sable provenant du lieu dit « Mer de sable » à Ermenonville (Oise).

Les échantillons ont été amenés à 5 p. 1.000 de carbone par apport de papier filtre dans un essai, et de paille broyée dans un autre essai. L'humidité a été maintenue constante pendant toute la durée de l'expérience.

Ici encore nous remarquons très rapidement un accroissement du nombre des germes du type *Cytophaga* suivi d'un enrichissement en *Azotobacter* (Voir courbes ci-jointes).



Les résultats de cette expérience confirment ceux trouvés précédemment avec la terre de Beauce et avec celle du sol de Camargue.

CONCLUSION. — Au cours de tous ces essais, nous avons confirmé et précisé les résultats obtenus par Pochon et Tchan et nous avons constaté que, quelle que soit la nature de nos échantillons, il existe un lien étroit entre la microflore fixatrice (*Azotobacter*) et la microflore cellulolytique du type *Cytophaga*. Nous avons également pu montrer que la progression du nombre des cellulolytiques est suivie d'une augmentation du nombre de germes fixateurs.

Il nous est cependant impossible pour le moment de préciser le mécanisme intime d'une telle symbiose.

Il semble que, d'après des travaux récents, l'oxycellulose ne soit pas le stade intermédiaire de la dégradation de la cellulose par les *Cytophaga*, mais que le glucose récemment mis en évidence pourrait être utilisé comme aliment hydrocarboné par les *Azotobacter*.

(Travail fait au Laboratoire de Zoologie de l'E. N. S.
et à l'Institut Pasteur, Laboratoire de J. POCHON.)

TRANSMISSION DE LA VERRUE COMMUNE AU SINGE CYNOCÉPHALE (*PAPIO PAPIO*)

par PASCU ATANASIU.

Si la transmission de la verrue d'homme à homme est aujourd'hui un fait bien prouvé, soit par des observations cliniques [Variot (1)], soit par des expériences faites directement sur des volontaires [Jadassohn (2), L. Kingeri (3)], le passage aux animaux, à l'exception du papillome laryngé (Ulmann, 1923) reste encore un problème à résoudre.

D'innombrables essais ont été faits en prenant comme animaux d'expérience soit le lapin chez lequel on a employé la voie d'inoculation intratesticulaire [Willson (4)], soit la chienne (voie vaginale, Ullman) soit la souris (voie intracérébrale).

La spécificité d'un virus filtrable [Ciuffo (5)] transmissible d'homme à homme ayant été démontrée maintes fois, il restait à en faire l'étude expérimentale sur un animal réceptif. Mais « les difficultés de l'expérimentation et le long délai d'incubation font que ce virus n'a jusqu'ici retenu que fort peu l'attention des chercheurs » ; c'est ce qui ressort de l'étude d'ensemble faite par R. Béquignon (6).

A notre tour, nous avons entrepris une série d'expériences sur des animaux de laboratoire (lapin, souris, singe) et sur l'homme, en employant comme voies d'inoculation les muqueuses (oculaires, préputiale), la peau et le testicule. Comme matériel d'inoculation, nous avons pris une émulsion diluée à 1/20 d'une verrue du type commun enlevée de la face dorsale des doigts d'un sujet, et à laquelle on a ajouté 50 U. O. de pénicilline par centimètre cube. Cette émulsion, inoculée dans la peau de la cuisse d'un ancien porteur de verrues ne s'est pas montrée virulente pour l'homme même après un délai de cinq mois, non plus que pour les lapins jeunes ou adultes inoculés par voie intratesticulaire, dans la muqueuse conjonctivale et préputiale, ni pour les souris inoculées par voie intracérébrale. Mais elle s'est avérée pathogène pour un singe cynocéphale (*Papio papio*). Le singe n° 195 a reçu le 21 juillet 1947, une série de piqûres dans le derme de la région préputiale et de la région inguinale bilatérale. Au bout de deux mois et demi environ, est apparue une petite saillie verruqueuse de consistance molle, située à la limite de la peau et de la muqueuse du pénis et ne différant pas de la couleur normale de la peau. Elle a augmenté lentement de volume et est arrivée à former, au bout de trois nouvelles semaines, une verrue cliniquement typique [date à laquelle a été pris

(1) VARIOT, *J. Clin. et Thérap. inf.*, 1893, **94**, 892.

(2) JADASSOHN, *Deutsche Derm. Gesellschaft V^e Congrès*, 1895, 497.

(3) L. KINGERI, *J. Am. med. Assoc.*, 1921, **76**, 440.

(4) WILLSON, *J. R. Army Med. Corps*, 1937, **68**, 227.

(5) CIUFFO, *Giorn. Ital. Malattie Vener.*, 1907, **42**, 12.

(6) R. BÉQUIGNON, C. LEVADITI et P. LÉPINE, *Traité des Ultravirus*, 2^e édition, 1948, sous presse.

le cliché (fig. 1)]. Molle au début, différente de la verrue souche, ce qui correspond à l'observation clinique des verrues génitales molles, la formation, après trois mois et demi est devenue dure et a changé de couleur, devenant presque jaune. Excisée en totalité à ce moment, nous avons procédé à l'examen microscopique.

Sur les coupes colorées (méthode trichrome de Masson ou hématoéline-

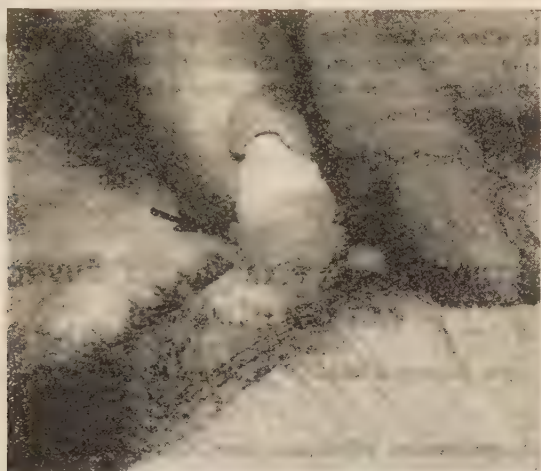


FIG. 1. — Verrue du singe n° 195 trois mois après l'inoculation.

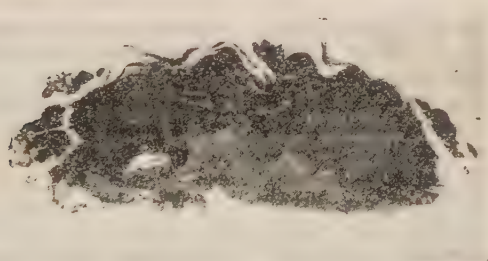


FIG. 2. — Coupe de la verrue excisée trois mois et demi après l'inoculation.

éosine) nous avons constaté, au milieu de la verrue, un prolongement papillaire entouré de cellules ayant subi une kératinisation. La couche filamenteuse est hypertrophiée et la couche cornée est anormalement développée, les cellules kératinisées contenant des noyaux dégénérés et la partie superficielle de cette couche présentant une desquamation. La coloration de Masson nous a montré que la masse était presque entièrement kératinisée (fig. 2).

Un second cynocéphale, inoculé en même temps que le premier, n'a présenté aucun symptôme par la suite.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION. — En inoculant un broyat de verrue commune à une série d'animaux de laboratoire, nous avons réussi à transmettre la maladie à un cynocéphale sur deux, dans la région préputiale, à la limite de la muqueuse et de la peau. Cette localisation explique peut-être que la formation ait passé par deux stades : l'un de consistance molle et l'autre au contraire de consistance dure. Cette formation reproduit macroscopiquement et microscopiquement la verrue commune de l'homme.

La période d'incubation chez le singe a été de deux mois et demi.

La transmission des verrues communes chez les animaux de laboratoire est, à notre avis, non seulement une question de race mais aussi une question d'individus.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

ÉTUDE SUR LA FIXATION DU CUIVRE PAR LES HÉMATIES

par HENRIETTE BERGER et MICHEL MACHEBOEUF.

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) ont porté sur la combinaison du cuivre avec les protéines. Nous envisageons maintenant la fixation du cuivre par des cellules entières : hématies de lapin.

Ce travail est en relation avec celui présenté aujourd'hui même par M. Lépine et M^{lle} Sautter sur la réaction de diagnostic de la grippe, car des traces de cuivre gênent cette réaction dans laquelle intervient des hématies.

Les hématies de lapin que nous avons utilisées avaient été préalablement lavées à plusieurs reprises par de l'eau salée isotonique préparée à partir d'eau bi-distillée et de chlorure de sodium bien purifié, afin d'éviter toute souillure par des traces de métaux.

Nous avons placé des suspensions d'hématies dans des sacs dialyseurs en collodion que nous avons plongés dans des solutions très diluées de sulfate cuivrique. Nous avons réalisé ces expériences à divers pH. A titre de comparaison, nous avons également opéré avec des hématies préalablement lysées par hypotonie.

Dans divers essais complémentaires, nous avons, enfin, introduit le cuivre dans le sac dialyseur au lieu de le mettre dans le liquide extérieur.

(1) MACHEBOEUF et VISCONTINI, *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **217**, 305.

(2) MACHEBOEUF et VISCONTINI, *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **248**, 977.

(3) MACHEBOEUF et VISCONTINI, *Ces Annales*, 1945, **71**, 188.

(4) MACHEBOEUF et VISCONTINI, *Ces Annales*, 1945, **72**, 631.

(5) CHAMPAGNE (M^{lle}), MACHEBOEUF et VISCONTINI, *Ces Annales*, 1946, **72**, 638.

(6) H. BERGER et M. MACHEBOEUF, *Ces Annales*, 1947, **73**, 879.

(7) H. BERGER et M. MACHEBOEUF, *Ces Annales*, 1947, **73**, 882.

Tous nos essais ont été effectués dans une glacière au voisinage de + 4°.

Le cuivre fut dosé dans les hématies par la méthode de Spacu (8) qui permet d'opérer sur des quantités de cuivre de l'ordre de 10 à 120 microgrammes avec une erreur absolue qui ne dépasse pas 5 microgrammes.

EXPÉRIENCE EN MILIEU ACIDE. — Le tableau ci-contre indique les conditions et les résultats d'une série d'expériences dans lesquelles les hématies furent en contact avec les solutions cuivriques pendant cinq jours, puis ensuite soumises pendant deux jours à la dialyse contre des solutions sans cuivre, afin d'éliminer le métal non fixé.

EXPÉRIENCES à pH 6,5	CONTENU INITIAL des sacs dialyseurs				LIQUIDE extérieur aux sacs et qui fut renouvelé 4 fois à 24 heures d'intervalle		LIQUIDE extérieur aux sacs pendant les 2 derniers jours	Cu retrouvé dans le contenu des sacs en γ
	Purée hématique en cm ³	Eau distillée en cm ³	Eau physiologique en cm ³	Cu	Eau physiologique en cm ³	Cu en γ	Eau physiologique sans Cu en cm ³	
I. Hématies non lysées. . .	2	0	8	0	200	40	200	32
II. Hématies lysées. . . .	2	8	0	0	200	40	200	93

Quelques conclusions se dégagent déjà :

1° A pH 6,5 les hématies fixent du cuivre.

2° Les hématies lysées en fixent beaucoup plus.

EXPÉRIENCE EN MILIEU ALCALIN. — Nos travaux antérieurs ont montré que les protéines fixent beaucoup plus de cuivre en milieu nettement alcalin qu'en milieu neutre ou acide. Nous avons donc effectué des essais à pH 10,5 mais, dans ces conditions, le cuivre n'est plus intégralement à l'état d'ions Cu^{++} , mais en majeure partie à l'état d'hydrate ou de carbonate colloïdal. Son passage à travers les membranes du dialyseur pouvait être fortement gêné par ce fait, aussi avons-nous effectué parallèlement des essais dans lesquels le cuivre était placé à l'extérieur des sacs et d'autres dans lesquels le cuivre était introduit dans les sacs dialyseurs. Dans ce cas, nous avons ajouté une nouvelle dose de 40 γ de cuivre chaque jour dans les sacs.

Dans chacune des expériences rapportées dans ces tableaux, la quantité totale de Cu mise en œuvre en cinq jours a été de 200 γ .

(8) SPACU, *Zeitschr. Anal. Chem.*, 1927, **74**, 97, 185, 442 ; **72**, 289 ; 1928, **73**, 279-356.

EXPÉRIENCES à pH 10,5	CONTENU INITIAL des sacs dialyseurs				LIQUIDE extérieur aux sacs et qui fut renouvelé 4 fois à 24 heures d'intervalle			LIQUIDE extérieur aux sacs pendant les 2 derniers jours	Cu retrouvé dans le contenu des sacs en γ
	Purée hématique en cm ³	Eau distillée en cm ³	Eau physiologique en cm ³	Cu en γ	Eau physiologique en cm ³	CO ² Na ²	Cu en γ	Eau physiologique sans Cu ni CO ² Na ² en cm ³	
III. Hématies non lysées .	2	0	8	0	200	200	40	200	23
IV. Hématies lysées. . . .	2	8	0	0	200	200	40	200	53
V. Hématies non lysées. .	2	0	8	40	200	200	0	200	25
VI. Hématies lysées. . . .	2	8	0	40	200	200	0	200	140

CONCLUSIONS. — Les hématies non lysées fixent du cuivre en milieu neutre et également en milieu alcalin, mais l'alcalinité ne favorise pas cette fixation. Nous savons déjà que l'alcalinité favorise au contraire considérablement la fixation du cuivre par les protéines. Le phénomène de fixation du Cu par les hématies non lysées n'est donc pas simplement comparable à la fixation par des protéines non incluses dans une cellule. D'ailleurs, lorsque les hématies sont lysées, on se retrouve dans le cas général de protéines en solution et l'on voit l'alcalinité influer considérablement.

Aussi bien en milieu neutre qu'en milieu alcalin, les hématies lysées fixent beaucoup plus de cuivre que les hématies intactes. Lorsque les protéines sont incluses dans la cellule, la réaction est inhibée. Ceci peut être dû à une impossibilité de pénétration du cuivre dans l'hématie ou bien à un défaut de réactivité des protéines incluses dans la cellule.

(Institut Pasteur.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Technique du maintien de la faible virulence du BCG. Etude expérimentale et critique à propos de travaux danois, par F. VAN DEINSE et M^{lle} A. PETROVA.

Toxine du « *Clostridium chauvoei* », par M^{lle} M. GUILLAUMIE et A. KREGUER.

Etude d'une cause d'erreurs dans les réactions d'hémagglutination. Rôle du cuivre, par M^{lle} V. SAUTIER et P. LEPINE.

Formes leucocytosiques de la leucopénie des chats, par V. PAVI-LANIS.

ÉLECTIONS

MM. LUTZ, DUCHÉ, CASALIS, SALOMON, LIÉOU, COHEN et FOURNIER, sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

Séance du 5 février 1948.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS

APPLICATION DE LA MICROSÉRORÉACTION DE JERMOLJEV ET HRUSKA AU DOSAGE DES VIRUS DES PLANTES

par P. LIMASSET et M^{lle} AUGIER DE MONTGREMIER.

Jermoljev et Hruska (1939), ont mis au point une méthode de diagnose très élégante applicable aux virus provoquant des Mosaïques chez la Pomme de terre. Cette méthode est un perfectionnement d'une technique de précipitation opérant par simple mélange d'une goutte de préparation virulente et d'une goutte d'immunsérum, due à Dunin et Popova (1937).

Jermoljev et Hruska ont eu l'idée heureuse d'examiner le précipité au microscope à fond noir. Leur méthode a été reprise en Allemagne par Stapp (1943) et en Belgique par Roland (1945), tandis qu'en Hollande van Slogteren et ses collaborateurs (1944) mettaient au point une microméthode de séroagglutination avec examen sans fond noir. Nous avons appliqué avec succès la technique de Jermoljev et Hruska pour la diagnose du virus de la Mosaïque du Tabac et des virus X et Y de la Pomme de terre. Nous avons tenté par ailleurs de l'appliquer au dosage de ces virus. D'excellents résultats ont été obtenus dans le cas du virus de la Mosaïque du Tabac.

Nous préparons une gamme de dilutions croissantes de la préparation virulente à étudier. Une goutte de chacune de ces dilutions est mélangée sur une lame de verre, avec une goutte d'immunsérum non dilué.

L'examen de la série de préparations est réalisé au fond noir, à l'aide de l'objectif 3 de Stiassnie, après une incubation de quinze minutes à 22°. On détermine la plus forte dilution donnant encore un précipité visible : c'est la dilution limite. Chaque dosage est effectué par compa-

raison avec une préparation étalon. Le rapport des concentrations en virus, c , de la préparation étudiée et, ce , de la préparation étalon est égal au rapport inverse de leurs dilutions limites $1/d$ et $1/de$:

$$\frac{c}{ce} = \frac{1/de}{1/d}.$$

Nous avons éprouvé la précision de la méthode, en l'appliquant à une série de dilutions d'une même préparation de virus de la Mosaïque du Tabac. Cette préparation qui servait d'étalon dans les dosages ultérieurs présentait une dilution limite de $1/600$. Quatre fractions furent extraites de celle-ci et diluées respectivement deux fois, douze fois, vingt-deux fois et quatre-vingt-douze fois. La dilution limite de chacune des quatre préparations nouvelles ainsi obtenues fut alors déterminée, l'opérateur ignorant leur titre réel. Le rapport de la dilution $1/600$ de la préparation étalon à la dilution $1/d$ de chaque préparation étudiée donnait le titre de cette dernière (rapport de sa concentration en virus à celle de la préparation étalon). Le titre réel étant connu, la précision de la méthode de dosage était dès lors facile à vérifier.

Le tableau ci-contre résume les résultats :

Préparation-étalon.	Dilut. limite : $1/600$.		
Préparation 1 (préparation-étalon diluée 2 fois) . . .	Dilut. limite : $1/350$.	Tit. calc. : $1/1,7$.	Tit. réel : $1/2$.
Préparation 2 (préparation-étalon diluée 12 fois) . .	Dilut. limite : $1/50$.	Tit. calc. : $1/12$.	Tit. réel : $1/12$.
Préparation 3 (préparation-étalon diluée 22 fois) . .	Dilut. limite : $1/25$.	Tit. calc. : $1/24$.	Tit. réel : $1/22$.
Préparation 4 (préparation-étalon diluée 92 fois) . .	Dilut. limite : $1/6,5$.	Tit. calc. : $1/92$.	Tit. réel : $1/92$.

L'erreur relative la plus grande de cette série d'essais est égale à $1/6,6$ (préparation 1). La marge d'imprécision tient d'une part aux erreurs de mesure effectuées sur l'échelle des dilutions et probablement aussi, pour une autre part, à de légères infidélités dans l'appréciation du dernier précipité visible. D'autres essais nous ont fourni des résultats d'une précision comparable.

Cette méthode se recommande par sa rapidité et son économie en sérum. A l'inverse de la méthode des lésions locales, elle permet de comparer valablement des résultats échelonnés dans le temps (il suffit pour cela que la richesse en anticorps du sérum n'ait pas varié).

Il va de soi que toutes les réserves qu'appelle la méthode sérologique s'appliquent à notre technique. On dose ainsi la protéine-virus et non le pouvoir infectieux. Or, pour des raisons que nous ne pouvons développer ici, le pouvoir infectieux n'est pas toujours proportionnel à la quantité de protéine-virus contenue dans la préparation.

Des recoupements par la méthode classique des lésions locales s'imposent donc lorsqu'on veut suivre parallèlement, par exemple au cours de l'inactivation d'un virus, la disparition du pouvoir antigène et celle du pouvoir infectieux.

(Station Centrale de Pathologie végétale, Versailles.)

SENSIBILITÉ DU BACILLE DE SCHMORL A LA PÉNICILLINE

par H. VELU et A. BOUFFANAIS.

Depuis longtemps les germes sensibles à la pénicilline ont été prospectés et l'on pourrait croire que la liste en est close.

Les hasards de la clinique nous en ont fait découvrir un dont la sensibilité ne semble pas avoir été signalée, à notre connaissance du moins, jusqu'à ce jour, bien que les observations de A. Lemierre et ses collaborateurs (1) sur *B. fundiliformis* avec lequel il présente de nombreuses affinités, aient pu attirer sur lui l'attention.

En présence d'une enzootie grave à bacille de Schmorl (*Bacillus necrophorus*) dans un important élevage de lapins, nous avons tenté le traitement par les filtrats bruts de pénicilline en injection intrapéritonéale. Les résultats ont été si encourageants (2), que nous avons cru indispensable de préciser la sensibilité *in vitro* de l'agent causal à la pénicilline G cristallisée.

Après isolement du germe en bouillon de foie sous huile additionné de fragments de foie, nous nous sommes servis pour les repiquages et les titrages du milieu de Truche, en tubes de Hall, amené à 20 g. de glucose.

La sensibilité à la pénicilline G cristallisée a été appréciée par comparaison avec le staphylocoque dont nous nous servons habituellement pour les titrages par dilution : les résultats ont été si éloignés de ceux que nous attendions que nous avons multiplié les essais avant de conclure. Voici les taux d'inhibition obtenus :

	DILUTION finale de l'inoculum	DOSES de pénicilline inhibitrices en U/cm ²	
		Essai n° 8	Essai n° 9
Staphylocoque.	1/10.000	0,03	0,04
Bacille de Schmorl	1/10.000	0,20	0,25
Rapport d'activité staph./Schmorl.		1/6,6	1/6,2

Nous avons également procédé à la comparaison de notre souche avec une autre, que nous devons à l'obligeance de M. Truche. La sensibilité a été exactement la même.

(1) A. LEMIERRE, J. REILLY, M. MORIN et M. RATHERY, *Presse méd.*, 1946, n° 4, 50.

(2) H. VELU, J.-V. MATHIEU et A. BOUFFANAIS, *Bull. Acad. Vét. de France*, 1948, 21, 37.

Nous avons utilisé pour l'ensemencement des tubes de la réaction, une dilution au 1/1.000 d'une culture de quelques heures de B. de Schmorl, comme nous employons celle de staphylocoque de 20-24 heures au 1/1.000 pour les titrages par dilution (dilution finale : 1/10.000).

Utilisé à ce taux, le bacille de Schmorl s'est constamment révélé six fois moins sensible environ que le staphylocoque, aussi bien avec la pénicilline G cristallisée qu'avec les filtrats bruts stabilisés. Comment, dès lors, expliquer l'activité considérable de ces derniers *in vivo* ? Nous ne pouvons faire que des hypothèses, notre expérimentation ayant été interrompue par la suppression de l'élevage pour des raisons qui n'avaient aucun rapport avec l'enzootie. Il est cependant permis de supposer que les filtrats de cultures à 300-400 U/cm³ dont nous nous sommes servis (3), stabilisés au formol selon la technique de G. Ramon et R. Richou (4), se sont comportés comme des antidotiques puissants, et que la véritable résurrection, en quelques heures parfois, de malades complètement stupéfiés, presque à l'agonie, a été provoquée par le facteur antidotique de G. Ramon (5) ; peut-être aussi par le ou les « facteurs d'exaltation » des Américains (6). L'injection à quelques malades de la pénicilline G pure cristallisée aurait probablement suffi pour lever les doutes. Nous n'avons pas eu la possibilité de la réaliser.

Signalons encore que l'action de la pénicilline n'est pas indépendante du nombre de germes et que la dose bactériostatique peut varier avec lui, ce qui confirme l'observation de R. Lintz (7) sur d'autres germes. Avec une dilution finale du bacille de Schmorl au 1/500, il nous a fallu 0,50 U. pour obtenir l'inhibition totale.

En résumé, le bacille de Schmorl, peu sensible *in vitro* à la pénicilline G cristallisée ou aux filtrats de cultures, s'est montré, au contraire, très sensible à ces mêmes filtrats chez des lapins naturellement infectés. La seule activité bactériostatique ne semble pas suffisante pour expliquer cette opposition, qui est peut-être due, soit au facteur antidotique de G. Ramon, soit aux facteurs d'exaltation des Américains.

RECHERCHES SUR *FUSOCILLUS PLAUTI*

par R. KOERBER et F. PATOCKA.

Les Fusiformes mobiles, ciliés, ont été longtemps confondus avec les fusiformes immobiles, aciliés. Prévot (1) en 1938, a proposé de les séparer et a réservé le genre *Fusiformis* Hoelling 1910 emend. pour les espèces immobiles, aciliées, espèce-type *Fusiformis fusiformis* (Vincent)

(3) H. PENAU, H. VELU, D. CHABANAS, D. BENOIST, *Bull. Acad. Méd.*, 1946, 130, 216.

(4) G. RAMON, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, 222, 261.

(5) G. RAMON et R. RICHOU, *C. R. Acad. Sci.*, 1946, 223, 368.

(6) G. L. HOBBY, T. FESSERT et B. HYMAN, *J. Bact.*, 1947, 54, 305.

(7) R. LINTZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 144, 863.

(1) A.-R. PRÉVOT, ces *Annales*, 1938, 60, 285.

T. et W., tandis qu'il réunissait les espèces mobiles et ciliées dans le nouveau genre *Fusocillus*, espèce-type *Fusocillus shmaminei* (Shmamine) P. 1938 ; ce genre, en 1940, ne comprenait qu'une autre espèce : *Fusocillus plauti* (Plaut) P. 1938 (2). Mais cette dernière était encore bien peu précise quand Séguin et Boisvert (3) ayant pu retrouver cet anaérobie dans la flore buccale de l'homme ont réussi à cultiver et à étudier quelques caractères encore inconnus de sa morphologie ; en particulier sa reproduction par granules bactériogènes, ciliés (monotriches) et argyrophiles, prenant naissance aussi bien dans les corps bactériens normaux que dans les sphéroïdes. Néanmoins, cette espèce restait encore très peu connue au point de vue de sa physiologie et de ses caractères biochimiques.

La souche 316 isolée récemment à Prague nous a permis de compléter son étude.

Il s'agit bien d'un fusiforme de grande taille comme l'avait vu Plaut : 15 μ de long en moyenne (avec des formes très longues de 23 μ), ondulé, à oscillations pendulaires et sinueuses lentes. Il ne résiste pas à un chauffage de quinze minutes à 80°. Il est peu réducteur : le rouge neutre vire lentement (neuvième jour) et la safranine n'est que temporairement réduite.

Il nécessite l'addition de sérum frais pour son isolement et pour les premières cultures, mais, peu à peu s'habitue aux milieux VF sans sérum. Les cultures ne sont pas gazogènes et dégagent une odeur désagréable, mais non fétide. Les colonies en gélose profonde sont lenticulaires. Trouble abondant en bouillon glucosé qui se dépose rapidement. La gélatine n'est pas liquéfiée ; le lait n'est pas coagulé ; les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Glucides : le lévulose et le maltose sont fortement fermentés. Le glucose, le galactose et le saccharose le sont faiblement. Les autres glucides ne le sont pas.

Biochimie : les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit NH_3 (0,034 g. pour 100 cm^3) ; indol, amines volatiles, aldéhydes, acétone ; acidité volatile totale : 0,156 g. pour 100 cm^3 consistant en acides acétique et butyrique (rapport compris entre 1/1 et 1/2) et acide lactique.

Pouvoir pathogène : En culture pure, la souche 316 n'a provoqué aucune lésion chez le cobaye. Elle ne secrète ni toxine, ni hémolysine.

Systématique : Cette étude montre qu'il s'agit d'une espèce bien individualisée par sa taille très grande, ses caractères cultureux et biochimiques nettement opposés aux fusiformes immobiles, d'une part, et, d'autre part, au sein du genre *Fusocillus*, aux espèces *F. shmaminei* (taille moyenne, colonies floconneuses, glucides non fermentés), *F. girans* (gazogène, coagulant le lait, ferment acéto-formique) et *F. pedipedis* (gazogène, non indologène, pathogène pour le mouton).

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies
et Clinique Médicale de la Faculté de Médecine de Prague.)

(2) Dans la 2^e édition de son Manuel de Classification des Anaérobies (sous presse), Prévot y a ajouté deux autres espèces : *Fusocillus girans* P. 1940 et *Fusocillus pedipedis* (Beveridge). nv. comb.

(3) SÉGUIN et BOISVERT, C. R. Soc. Biol., 1942, 136, 317.

**ÉTUDE D'UNE BACTÉRIE ANAÉROBIE NOUVELLE
DU FROMAGE DE GRUYÈRE FONDU :
CLOSTRIDIUM AROMATICUM n. sp.**

par F. LEBERT.

Au cours de l'examen bactériologique des produits alimentaires entrant dans la composition des rations conditionnées préparées actuellement pour l'Armée, il a été isolé d'une boîte 1/6^e basse de fromage de gruyère fondu, à 40 p. 100 de matière grasse, une nouvelle espèce anaérobie, dont voici la description.



FIG. 1. — *Clostridium aromaticum*, éléments normaux et éléments en voie de sporulation. (Cliché Lebert.)

MORPHOLOGIE. — Bâtonnets droits, à extrémités légèrement arrondies, longs de 1,8 à 4 μ sur 1 à 1,2 μ de large, rarement isolés, fréquemment associés par paires et moins souvent en courtes chaînettes de 4 à 8 éléments (fig. 1) ; mobiles par ondulations lentes, 8 à 10 cils péritriches (fig. 2) ; Gram positifs, spore déformante, subterminale, clostridienne, de forme ovale, mesurant 1,5 μ sur 1,3 μ .

PHYSIOLOGIE. — Anaérobie strict tolérant une faible tension d'oxygène ; poussant bien à 37°, moins bien à 32° ou à 26° ; thermorésistance : une minute à 100°. Longévité ne dépassant pas quatre à cinq mois en milieu de culture liquide, supérieure à six mois dans le milieu naturel (fromage). Germe strictement adapté à son milieu habituel, nécessitant pour son isolement, sa culture, son identification, un

bouillon et une gélose de type VF glucosé auquel ont été incorporés, au moment de la préparation, 40 g. par litre de fromage fondu. Pouvoir réducteur faible (réduit le rouge neutre en cinq jours, sans action sur la safranine et la phénosafranine).

CULTURE. — En gélose profonde au fromage ; petites colonies lenticulaires ou en oursins ; production de gaz et liquéfaction lente de la gélose. En eau peptonée au fromage : trouble uniforme avec dégagement gazeux, puis éclaircissement du milieu avec apparition d'un sédiment

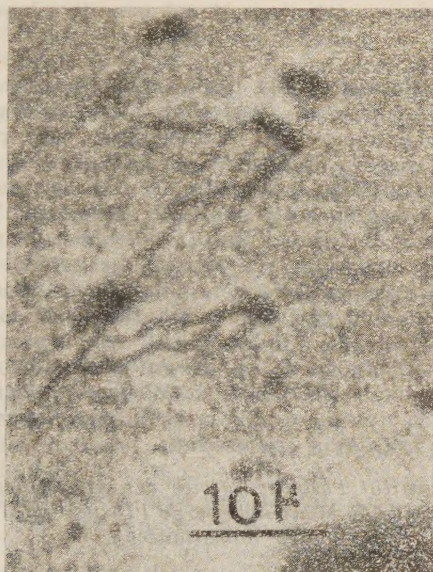


FIG. 2. — *Clostridium aromaticum*, coloration des cils par la technique de Levenson. (Cliché Pizon.)

fin et blanchâtre. En bouillon VF glucosé au fromage : mêmes caractères qu'en eau peptonée, mais avec un développement plus abondant et plus rapide ; dégagement gazeux. Dans le bouillon glucosé à 1 p. 100 âgé de quinze à dix-huit jours, ensemencé abondamment, il dégage une odeur forte nettement caractéristique du fromage de gruyère. La gélatine n'est pas liquéfiée ; le lait n'est pas coagulé ; le sérum coagulé, le blanc d'œuf coagulé, le foie, la cervelle, la fibrine, ne sont pas attaqués au dix-huitième jour. Le glucose est fermenté fortement et le lévulose moyennement avec formation abondante de gaz. Le maltose, le saccharose, la glycérine, la mannite, le lactose, le galactose, l'amidon ne sont pas fermentés. Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

BIOCHIMIE. — Les cultures ne produisent pas de dégagement de SH_2 . La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit 0,0034 g. de NH_3 pour 100 cm^3 de culture, une acidité volatile de 0,193 g. cons-

tituée par un mélange d'acides N-valérianique et propionique dans des proportions comprises entre 1 pour 4 et 1 pour 3, des traces d'acide lactique et des traces d'aldéhydes.

Un essai de fabrication de fromage type gruyère a été effectué au moyen d'un lait stérile ensemencé abondamment avec une culture de ce germe. Au bout d'un mois, le fromage obtenu n'avait aucune ressemblance avec un fromage type gruyère. Ce germe doit donc être considéré non comme un agent de fermentation de la pâte du fromage, mais comme un germe d'arôme du gruyère.

POUVOIR PATHOGÈNE. — Absolument nul pour le cobaye. Ni toxine, ni hémolysine.

TAXONOMIE. — Bâtonnet mobile, Gram positif, à spores clostridiennes ; ce germe appartient au genre *Clostridium* ; non pathogène, non butyrique, non cellulolytique, non pectinolytique, non protéolytique, il appartient au sous-genre résiduel IX proposé par Prévot (1). A l'intérieur de cette subdivision, il se distingue d'emblée des chromogènes. Il diffère de *Cl. lactopropylbutylicum* qui produit de l'indol et est un ferment propionique butyrique ; de *Cl. innominatum* qui produit SH_2 , acides acétique et butyrique, et acétylméthylcarbinol ; de *Cl. hastiforme*, qui a des colonies irrégulières, liquéfie la gélatine, coagule et digère le lait et produit SH_2 , acides N-butyrique et formique ; de *Cl. ureolyticum* qui dédouble l'urée ; de *Cl. irregularis*, non gazogène, ferment acéto-valérianique ; de *Cl. pruchii* non gazogène, qui liquéfie la gélatine et coagule le lait ; de *Cl. scatologenes* qui produit phénol et scatol. Il s'agit donc d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Clostridium aromaticum*.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies,
et Laboratoire de Microbiologie de l'Inspection Technique
des Subsistances.)

ÉTUDE DE DEUX SPHEROPHORACEÆ : *SPH. PSEUDONECROPHORUS* ET *FUSIFORMIS NUCLEATUS*

par L. A. ROBIN.

I. — *Spherophorus pseudonecrophorus* a été isolé par Harris et Brown, en 1927, dans les infections puerpérales de la femme ; ces auteurs avaient rattaché à tort cette espèce au genre *Actinomyces*. En 1938, Prévot a groupé toutes les Actinomycétales Gram-négatives dans la famille des *Spherophoraceæ* et rattaché l'espèce *pseudo-necrophorus* au genre *Spherophorus* (1). Cette espèce, très rare, n'avait pas été

(1) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition (sous presse). Masson, Paris, 1948.

(1) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition (sous presse). Masson, Paris, 1948.

retrouvée depuis cette époque et n'avait jamais été étudiée complètement. Dans un cas de phlegmon du cou chez une femme, une souche en a été isolée, associée à une souche de *Streptococcus putridus*. Nous avons pu ainsi compléter sa description : l'élément isolé mesure en moyenne $3\ \mu$ de long. Les éléments renflés, bifurqués, filamenteux et les sphéroïdes sont très abondants et très polymorphes.

La thermorésistance est nulle (la souche ne résiste pas à 70°). Le pouvoir réducteur est élevé (rouge neutre et phénosafranine réduits). En gélose profonde, les colonies d'abord punctiformes deviennent lenticulaires et restent minces et translucides. Les autres caractères culturels sont bien ceux qui ont été décrits par les auteurs, mais en plus des glucides notés par eux comme étant fermentés, notre souche attaquait aussi le lévulose et le galactose. La fermentation du bouillon VF glucosé produit de l'indol, NH_3 , SH_2 , des amines volatiles, des cétones, de l'acétylméthylcarbinol et les acides propionique, butyrique et lactique.

Le cobaye n'est pas le seul animal réceptif. Chez la lapine, l'injection intraveineuse de culture jeune provoque une septicémie mortelle avec congestion pulmonaire de caractère nécrotique ; le liquide de centrifugation des cultures est également toxique. De même, les microbes lavés sont pathogènes, car l'injection intraveineuse de leur suspension en eau physiologique tue la lapine avec les mêmes lésions nécrotiques, mais cette espèce ne sécrète pas d'hémolysine.

Ainsi, *Sph. pseudo-necrophorus* voit son autonomie nettement confirmée, ses caractères la distinguent bien des espèces voisines : *necrophorus*, *funduliformis*, *necrogenes* et *necroticus*.

II. — *Fusiformis nucleatus* a été décrit par Knorr en 1923 et cette espèce était restée douteuse, car quelques auteurs lui avaient attribué des caractères de *Sph. funduliformis* (par suite de détermination erronée). Il s'agit d'une espèce assez rare et difficile à isoler et à cultiver. Nous en avons isolé une souche dans un cas d'actinomycose de la face (2) où elle était associée à *Actinobacterium abscessus*.

Voici les caractères complémentaires que nous avons mis en évidence par l'étude de cette souche :

A côté des formes moyennes habituelles, elle présente des formes longues de 7 à $15\ \mu$ sur $0,4\ \mu$. Le pouvoir réducteur est marqué. (rouge neutre et phénosafranine réduits). Les cultures exigent l'addition de sérum frais. A côté des colonies lenticulaires en gélose profonde, on voit des colonies irrégulières opaques, constellées de petites colonies ovales, translucides. La gélatine n'est pas liquéfiée ; le lait n'est pas coagulé, les protéines ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fermentés : glucose, lévulose, galactose et saccharose ; le lactose l'est faiblement.

Les nitrates sont réduits en nitrites.

Les souris injectées avec la culture meurent sans présenter de lésion apparente.

La fermentation du bouillon VF glucosé produit de l'indol ; NH_3 ;

(2) Ce cas nous a été adressé par le Dr Béal, stomatologiste des Hôpitaux de Paris. Nous l'en remercions vivement. Une étude bactérioclinique des actinomycoses de la face paraîtra bientôt, présentée par A.-R. Prévot et Béal.

SH₂ ; des amines volatiles, des cétones, de l'acétylméthylcarbinol, et les acides propionique, valériannique et lactique.

Cette étude lève le doute qui planait sur cette espèce nettement différente de *F. fusiformis* (Vincent) T et W, de *Fusiformis polymorphus*, récemment réétudié par Prévot et Peyré qui ont pu ainsi confirmer son individualité (3), et de *F. biacutus*. Seule de ce groupe, l'espèce *F. vescus* (E et G) P. reste encore douteuse, n'ayant jamais été retrouvée ni étudiée depuis sa description sommaire en 1935.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

La lyse des cultures de bacilles tuberculeux sur pomme de terre à l'eau glycinée et la lyse des bacilles tuberculeux morts en suspension aqueuse à l'abri de l'air à 38°, par F. VAN DEINSE.

Action des savons à cation actif sur les protéines. I. Précipitation de la sérumalbumine par un cation gras. II. Précipitation des protéines du sérum par un cation gras, par J. POLONOVSKI et M. MACHEBŒUF.

ÉLECTIONS

M^{lle} GAUDINEAU, MM. BARTHELET, DARPOUX, LANSADÉ, OLIVIER, DODERO, MÉRIEUX et MOLLARET sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

(3) A.-R. PRÉVOT et M. PEYRÉ, ces *Annales*, 1947, 73, 1124.

Le Gérant : G. MASSON.